

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 883**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2009 PCT/AU2009/001488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010 WO10057246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2009 E 09827035 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2358882**

54 Título: **Enzimas y métodos para producir ácidos grasos omega-3**

30 Prioridad:

**18.11.2008 US 199669 P**

**09.07.2009 US 270710 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.11.2017**

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH ORGANISATION (50.0%)**

**Black Mountain Science and Innovation Park  
Clunies Ross Street**

**Acton ACT 2601, AU y**

**GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT  
CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PETRIE, JAMES, ROBERTSON;**

**MACKENZIE, ANNE MAREE;**

**LIU, QING;**

**SHRESTHA, PUSHKAR;**

**NICHOLS, PETER DAVID;**

**BLACKBURN, SUSAN, IRENE, ELLIS;**

**MANSOUR, MAGED, PETER;**

**ROBERT, STANLEY, SURESH;**

**FRAMPTON, DION, MATTHEW, FREDERICK;**

**ZHOU, XUE-RONG;**

**SINGH, SURINDER, PAL y**

**WOOD, CRAIG, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 644 883 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

Enzimas y métodos para producir ácidos grasos omega-3

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para sintetizar ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, en especial ácido eicosapentanoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexanoico, en células recombinantes tales como células de levadura o vegetales. También se proporcionan células o plantas recombinantes que producen ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados. Además, la presente invención se refiere a un grupo de nuevas enzimas que presentan actividad desaturasa o elongasa que se pueden usar en métodos para sintetizar ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados. En particular, la presente invención proporciona  $\omega 3$  desaturasas,  $\Delta 5$  elongasas y  $\Delta 6$  desaturasas con actividades novedosas. También se proveen métodos y construcciones de ADN para transformar, de forma transitoria y/o estable, células, en particular células vegetales, con múltiples genes.

15 **Antecedentes de la invención**

Los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados omega-3 (LC-PUFA y VLC-PUFA) se reconocen ampliamente en la actualidad como importantes compuestos para la salud de seres humanos y animales. Estos ácidos grasos se pueden obtener de la dieta o por conversión de los ácidos grasos linoleico (LA, 18:2 $\omega 6$ ) o  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3 $\omega 3$ ), ambos considerados como ácidos grasos esenciales en la dieta humana. Aunque los seres humanos y muchos otros animales vertebrados pueden convertir LA o ALA, obtenido de fuentes vegetales, en VLC-PUFA, realizan esta conversión a una velocidad muy baja. Más aún, la mayoría de las sociedades modernas tienen dietas desequilibradas en las cuales al menos un 90 % de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son de ácidos grasos  $\omega 6$ , en lugar de la relación de 4:1 o menos para los ácidos grasos  $\omega 6:\omega 3$  considerada ideal (Trautwein, 2001). La fuente inmediata de la dieta de los VLC-PUFA tal como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 $\omega 3$ ) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 $\omega 3$ ) en humanos proviene mayormente del pescado o del aceite de pescado. Por ello los profesionales de la salud han recomendado la inclusión regular de pescado que contiene niveles significativos de VLC-PUFA en la dieta humana. Los aceites VLC-PUFA derivados del pescado se están incorporando cada vez más, por ejemplo, en los productos alimentarios y en fórmulas infantiles. Sin embargo, debido a una disminución de las pesquerías globales y nacionales, se necesitan fuentes alternativas de estos aceites beneficiosos que mejoran la salud.

Las plantas superiores, a diferencia de los animales, no tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados con longitudes de cadena mayores que 18 carbonos. En particular, las plantas de cultivo y de horticultura junto con otros angiospermas no tienen las enzimas necesarias para sintetizar los ácidos grasos  $\omega 3$  de cadena más larga tales como EPA, ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 $\omega 3$ ) y DHA que derivan de ALA. Un objetivo importante en la biotecnología de plantas es entonces la manipulación de plantas de cultivo que producen cantidades sustanciales de VLC-PUFA, proporcionando de esa manera una fuente alternativa de estos compuestos.

40 Vías de biosíntesis de VLC-PUFA

La biosíntesis de los VLC-PUFA en organismos tales como algas microscópicas, musgos y hongos habitualmente tiene lugar como una serie de reacciones de desaturación y elongación dependientes de oxígeno (Figura 1). La vía más común que produce EPA en estos organismos incluye una desaturación  $\Delta 6$ , una elongación  $\Delta 6$  y una desaturación  $\Delta 5$  (conocida como la vía de desaturación  $\Delta 6$ ) en tanto una vía menos común utiliza una elongación  $\Delta 9$ , una desaturación  $\Delta 8$  y una desaturación  $\Delta 5$  (conocida como la vía de desaturación  $\Delta 9$ ). Estas reacciones consecutivas de desaturación y elongación pueden comenzar con el sustrato de ácido graso  $\omega 6$  LA, que se muestra esquemáticamente como la parte superior izquierda de la Figura 1 ( $\omega 6$ ) o el sustrato  $\omega 3$  ALA, que se muestra en la parte inferior derecha de la Figura 1 ( $\omega 3$ ). Si la desaturación  $\Delta 6$  inicial se efectúa sobre el sustrato  $\omega 6$  LA, el producto de VLC-PUFA de la serie de tres enzimas será el ácido graso  $\omega 6$  ARA. Los organismos que sintetizan VLC-PUFA pueden convertir ácidos grasos  $\omega 6$  en ácidos grasos  $\omega 3$  usando una  $\omega 3$  desaturasa, que se muestra como el paso  $\Delta 17$ -desaturasa en la Figura 1 para la conversión de ácido araquidónico (ARA, 20:4 $\omega 6$ ) en EPA. Algunos miembros de la familia de  $\omega 3$ -desaturasas pueden actuar sobre varios sustratos que varían en un rango entre LA y ARA. Las  $\omega 3$ -desaturasas vegetales a menudo catalizan específicamente la desaturación  $\Delta 15$  de LA en ALA, en tanto las  $\omega 3$ -desaturasas fúngicas y de levadura pueden ser específicas para la desaturación  $\Delta 17$  de ARA en EPA (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Algunos informes sugieren que pueden existir  $\omega 3$ -desaturasas no específicas que pueden convertir una amplia variedad de sustratos  $\omega 6$  en sus correspondientes productos  $\omega 3$  (Zhang et al., 2007). Otras  $\omega 3$ -desaturasas pueden tener preferencia por los sustratos  $\omega 3$  (Sayanova et al., 2003).

La conversión de EPA en DHA en estos organismos es relativamente simple, y consiste en una elongación  $\Delta 5$  de EPA para producir DPA, seguido por una desaturación  $\Delta 4$  para producir DHA (Figura 1). Por el contrario, los mamíferos emplean la vía conocida como "Sprecher" que convierte DPA en DHA mediante tres reacciones separadas que son independientes de una  $\Delta 4$  desaturasa (Sprecher et al., 1995).

Las desaturasas *front-end* [desaturasas que introducen un doble enlace entre un doble enlace preexistente y el extremo carboxílico de su sustrato] halladas en general en plantas, musgos, algas microscópicas y animales inferiores tal como *Caenorhabditis elegans* aceptan predominantemente los sustratos de ácido graso esterificados en la posición *sn*-2 de un sustrato de fosfatidilcolina (PC). Por ello estas desaturasas son conocidas como desaturasas *front-end*, acil-PC, ligadas a lípidos (Domergue et al., 2003). Por el contrario, las desaturasas *front-end* de animales superiores generalmente aceptan sustratos de acil-CoA donde el sustrato de ácido graso está ligado a CoA en lugar de PC (Domergue et al., 2005).

Cada reacción de elongación de PUFA y VLC-PUFA consiste en cuatro pasos catalizados por un complejo proteico de múltiples componentes: primero, una reacción de condensación da como resultado la adición de una unidad 2C de malonil-CoA en el ácido graso, dando como resultado la formación de un intermediario  $\beta$ -cetoacilo. Este es reducido luego por NADPH, seguido por una deshidratación para obtener un intermediario enoílo. Finalmente se reduce este intermediario una segunda vez para producir el ácido graso elongado. Se cree en general que el paso de condensación de estas cuatro reacciones es específico del sustrato en tanto los otros pasos no lo son. En la práctica, esto significa que la maquinaria de elongación nativa de la planta tiene la capacidad de elongar los VLC-PUFA siempre que se introduzca la enzima de condensación (normalmente denominada 'elongasa') específica del VLC-PUFA, aunque la eficacia de la maquinaria de elongación nativa de la planta en la elongación de los sustratos VLC-PUFA no nativos puede ser baja. En 2007 se publicó la identificación y caracterización de la deshidratasa del ciclo de elongación de levadura (Denic y Wissman, 2007).

La desaturación de VLC-PUFA en plantas, musgos y algas microscópicas tiene lugar naturalmente en sustratos de ácidos grasos, predominantemente en la agrupación de acil-PC, en tanto la elongación tiene lugar en sustratos de la agrupación acil-CoA. La transferencia de ácidos grasos de las moléculas de acil-PC a un transportador CoA es realizada por las fosfolipasas (PLA), en tanto la transferencia de ácidos grasos acil-CoA a un transportador PC es realizada por las lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (Figura 2) (Singh et al., 2005). La reducción en el flujo debido a un intercambio de acilo que debe tener lugar antes de la desaturación puede seguir a una elongación, o viceversa, puede efectuarse mediante el uso de una desaturasa con especificidad por sustratos acil-CoA (Hoffmann et al., 2008).

### Producción manipulada mediante ingeniería genética de VLC-PUFA

La mayor parte de la manipulación mediante ingeniería genética de VLC-PUFA se ha realizado usando la vía de desaturación/elongación  $\Delta 6$  aeróbica. La biosíntesis de ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA, 18:3 $\omega$ 6) en tabaco fue descrita por primera vez en 1996 usando una  $\Delta 6$ -desaturasa de la cianobacteria *Synechocystis* (Reddy y Thomas, 1996). Más recientemente, se ha producido GLA en plantas de cultivo tal como alazor (73 % de GLA; Knauf et al., 2006) y soja (28 % GLA; Sato et al., 2004). La producción de VLC-PUFA, tales como EPA y DHA, comprende una manipulación más complicada debido al mayor número de pasos de desaturación y elongación involucrado. La producción de EPA en una planta de campo fue informada primero por Qi et al. (2004) quienes introdujeron genes que codifican una  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana*, una  $\Delta 8$ -desaturasa de *Euglena gracilis* y una  $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* en *Arabidopsis* produciendo hasta un 3 % de EPA. Este trabajo fue seguido por Abbadi et al. (2004) quienes informaron la producción de hasta un 0,8 % de EPA en semillas de lino usando genes que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa y una  $\Delta 6$ -elongasa de *Physcomitrella patens* y una  $\Delta 5$ -desaturasa de *Phaeodactylum tricornutum*.

El primer informe de la producción de DHA, y hasta la fecha los niveles más altos de producción de VLC-PUFA informados, fue en WO 04/017467, donde se describe la producción de 3 % de DHA en embriones soja, pero no en semillas, mediante la introducción de genes que codifican la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, la  $\Delta 4$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, la  $\Delta 17$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, la  $\Delta 6$ -elongasa de *Mortierella alpina* y la 5-elongasa de *Pavlova lutheri*. El nivel máximo de EPA en embriones que también producían DHA era del 19,6 %, lo cual indica que la eficacia de conversión de EPA en DHA era pobre (WO 2004/071467). Este hallazgo era similar a lo publicado por Robert et al. (2005), donde el flujo de EPA en DHA era bajo, con una producción de 3 % de EPA y 0,5 % de DHA en *Arabidopsis* usando la  $\Delta 5/6$ -desaturasa de *Danio rerio*, la  $\Delta 6$ -elongasa de *Caenorhabditis elegans* y la  $\Delta 5$ -elongasa y  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina*. También en 2005, Wu et al. publicaron la producción de 25 % de ARA, 15 % de EPA y 1,5 % de DHA en *Brassica juncea* usando la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Pythium irregulare*, una  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrid*, la  $\Delta 6$ -elongasa de *Physcomitrella patens*, la  $\Delta 12$ -desaturasa de *Calendula officinalis*, una  $\Delta 5$ -elongasa de *Thraustochytrid*, la  $\Delta 17$ -desaturasa de *Phytophthora infestans*, la VLC-PUFA elongasa de *Oncorhynchus mykiss*, una  $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrid* y una LPCAT de *Thraustochytrid* (Wu et al., 2005).

Por ello persiste la necesidad de una producción más eficaz de LC-PUFA en células recombinantes, en particular en semillas de plantas de semillas oleaginosas.

### **Resumen de la invención**

Los inventores de la presente invención han identificado por primera vez una  $\Delta 5$  elongasa que convierte eficazmente EPA en DPA en una célula recombinante.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que sintetiza ácido docosapentanoico (DPA), en la que la célula se ha derivado de una célula que no tiene capacidad de sintetizar DPA, y en el que la célula recombinante comprende polinucleótidos exógenos que codifican:

- 5
- i) una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa
  - ii) una  $\Delta 8$  desaturasa y/o una  $\Delta 6$  desaturasa,
  - iii) una  $\Delta 9$  elongasa y/o una  $\Delta 6$  elongasa,
  - iv) una  $\Delta 5$  desaturasa y
  - 10 v) opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en la que la  $\Delta 5$  elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 % o al menos un 75 % cuando la elongasa se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en la célula, y en el que la  $\Delta 5$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6.

Los inventores de la presente invención también han identificado una  $\omega 3$  desaturasa con nuevas propiedades. La  $\omega 3$  desaturasa es de utilidad en las vías recombinantes diseñadas para obtener EPA, los ácidos grasos descendentes en la vía DPA y DHA y otros  $\omega 3$  VLC-PUFA.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica una ácido graso desaturasa con actividad  $\omega 3$  desaturasa, en donde la desaturasa tiene la capacidad de desaturar al menos uno entre ARA en EPA, DGLA en ETA, GLA en SDA, tanto ARA en EPA como DGLA en ETA, tanto ARA en EPA como GLA en SDA, o los tres cuando la desaturasa se expresa a partir del polinucleótido exógeno en la célula.

La desaturasa es preferentemente una desaturasa *front-end*.

En otro aspecto, la desaturasa tiene actividad  $\Delta 17$  desaturasa sobre un ácido graso C20 que tiene al menos tres dobles enlaces carbono-carbono en su cadena de acilo, preferentemente ARA.

En otro aspecto, la desaturasa tiene actividad  $\Delta 15$  desaturasa sobre un ácido graso C18 que tiene tres dobles enlaces carbono-carbono en su cadena de acilo, preferentemente GLA.

La desaturasa preferentemente tiene mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que un correspondiente sustrato de acil-PC.

En un aspecto, el sustrato de acil-CoA es ARA-CoA y el sustrato de acil-PC comprende ARA en la posición sn-2 de PC.

En otro aspecto más, la célula es una célula vegetal y la desaturasa tiene actividad sobre ARA para producir EPA con una eficacia de al menos 40 % cuando se expresa a partir del polinucleótido exógeno en la célula.

En un aspecto particular, la desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:15, 17 o 20, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 35 % idéntica a la SEQ ID NO:15, al menos un 60 % idéntica a la SEQ ID NO:17 y/o al menos un 60 % idéntica a la SEQ ID NO:20.

Además, los inventores de la presente invención han identificado un gen que codifica una  $\Delta 6$  desaturasa que tiene una mayor eficacia de conversión por sustratos de ácidos grasos  $\omega 3$  que por el correspondiente sustrato de ácidos grasos  $\omega 6$  en plantas y/o en levadura. Esta  $\Delta 6$  desaturasa también exhibe actividad  $\Delta 8$  desaturasa. El uso de esta  $\Delta 6$  desaturasa o de otras desaturasas con una gran especificidad por sustratos de ácidos grasos  $\omega 3$  desaturados en las vías de LC-PUFA recombinantes en plantas incrementa los niveles de EPA, DPA y DHA con relación al uso de desaturasas sin preferencia por sustratos de ácidos grasos  $\omega 3$  desaturados.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso desaturasa con actividad desaturasa  $\Delta 6$ , en donde la desaturasa se caracteriza además por presentar al menos dos, preferentemente los tres, de los siguientes;

- i) mayor actividad desaturasa  $\Delta 6$  sobre ALA que LA como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal,

- ii) mayor actividad desaturasa  $\Delta 6$  sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal, y
- iii) actividad desaturasa  $\Delta 8$  sobre ETrA, preferentemente en una célula vegetal.

5 La presente memoria descriptiva proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica una ácido graso desaturasa con actividad desaturasa  $\Delta 6$ , en donde la desaturasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 3$  que el correspondiente sustrato  $\omega 6$ , y en donde la desaturasa tiene actividad sobre ALA para producir SDA con una eficacia de al menos un 5 %, al menos un 7,5 % o al menos un 10 % cuando la desaturasa se expresa a partir del polinucleótido exógeno en la célula, o al menos un 35 % cuando se expresa en una célula de levadura.

10 En un aspecto, la desaturasa tiene mayor actividad desaturasa  $\Delta 6$  sobre ALA que LA como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal.

15 La desaturasa tiene preferentemente  $\Delta 6$  al menos aproximadamente 2 veces más actividad desaturasa  $\Delta 6$ , al menos 3 veces más actividad, al menos 4 veces más actividad o al menos 5 veces más actividad, sobre ALA como un sustrato en comparación con LA, preferentemente en una célula vegetal.

20 En otro aspecto, la  $\Delta 6$  desaturasa tiene mayor actividad sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal.

25 La  $\Delta 6$  desaturasa tiene preferentemente por lo menos aproximadamente 5 veces más actividad desaturasa  $\Delta 6$  o al menos 10 veces más actividad, sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal.

La  $\Delta 6$  desaturasa es preferentemente una desaturasa *front-end*.

30 En otro aspecto más, la célula de acuerdo con la invención comprende además polinucleótidos exógenos que codifican;

- i) una  $\Delta 6$  elongasa,
- ii) una  $\Delta 5$  desaturasa,
- iii) una  $\Delta 5$  elongasa, y
- iv) opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

35 en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

40 La  $\Delta 6$  desaturasa en la célula no tiene preferentemente una actividad  $\Delta 5$  desaturasa sobre ETA detectable.

La  $\Delta 6$  desaturasa comprende preferentemente aminoácidos que tienen una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:10, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 77 % idéntica a la SEQ ID NO:10.

45 En otro aspecto, la  $\Delta 6$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:8, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 67 % idéntica a la SEQ ID NO:8 y tiene actividad  $\Delta 8$  desaturasa.

50 Los inventores de la presente invención también han descubierto que las células recombinantes que expresan  $\Delta 9$  elongasa,  $\Delta 8$  desaturasa y  $\Delta 5$  desaturasa pueden convertir más eficazmente un sustrato de ácido grasos en EPA, DPA y DHA.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende polinucleótidos exógenos que codifican;

- i) una  $\Delta 9$  elongasa,
- ii) una  $\Delta 8$  desaturasa,
- iii) una  $\Delta 5$  desaturasa,
- iv) opcionalmente una  $\Delta 5$  elongasa, y
- v) si la  $\Delta 5$  elongasa está presente, opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa,

60 en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, y en donde al menos un 15 %, al menos un 20 % o al menos un 25 %, de los

ácidos grasos totales en la célula comprenden al menos 20 carbonos y al menos 3 dobles enlaces carbono-carbono en su cadena de acilo.

5 En una realización, la suma total de ARA, EPA, DPA y DHA en los ácidos grasos de la célula de la invención comprende al menos 15 %, al menos 20 % o al menos 25 % de los ácidos grasos totales en la célula.

10 En una realización adicional, la célula de acuerdo con la invención presenta una capacidad reducida para convertir el ácido oleico en ácido eicosenoico (C20:1) en comparación con una planta de tipo salvaje y/o menos que un 5 % del ácido oleico es convertido en ácido eicosenoico en la célula.

15 En una realización particular, los ácidos grasos totales en la célula comprenden menos que 1 % de C20:1.

20 En una realización adicional, la célula de acuerdo con la invención tiene una actividad  $\Delta 15$  desaturasa endógena reducida en comparación con una célula de tipo salvaje, y/o menos que un 10 % del LA es convertido en ALA en la célula.

25 En una realización particular, la  $\Delta 15$  desaturasa endógena tiene mayor actividad sobre un sustrato de acil-PC que sobre el correspondiente sustrato de acil-CoA, preferentemente cuando el grupo acilo es LA.

30 En una realización adicional, la célula de la invención comprende además una mayor conversión de GLA en SDA y/o de ARA en EPA con relación a la correspondiente célula que no contiene a los polinucleótidos exógenos.

35 En una realización, la cantidad de DHA en los ácidos grasos de la célula de la invención es de al menos un 3 %, al menos un 5 % o al menos un 10 %, de los ácidos grasos totales en la célula.

40 En otra realización, la eficacia de conversión de LA en ARA y/o de ALA en EPA en la célula de la invención es de al menos un 80 % o al menos un 90 %.

45 En una realización, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:22, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:22.

50 En una realización adicional, la  $\Delta 8$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:24, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:24.

55 En una realización más, la  $\Delta 5$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:26 o en la SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:26 y/o a la SEQ ID NO:13.

60 Los inventores de la presente invención han obtenido resultados que indican que se puede utilizar un conjunto de genes que expresan la  $\Delta 6$ -desaturasa, la  $\Delta 6$  elongasa, la  $\Delta 5$  desaturasa, la  $\Delta 5$  elongasa y la  $\Delta 4$  desaturasa, o un conjunto similar de genes en particular cuando las desaturasas son activas sobre sustratos de acil-CoA, para sintetizar niveles sustanciales de EPA, DPA y DHA.

65 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende polinucleótidos exógenos que codifican;

- 50 i) una  $\Delta 6$  elongasa y/o una  $\Delta 9$  elongasa,
- ii) una  $\Delta 6$  desaturasa y/o una  $\Delta 8$  desaturasa,
- iii) una  $\Delta 5$  desaturasa,
- iv) una  $\Delta 5$  elongasa,
- v) una  $\Delta 4$  desaturasa, y
- 55 vi) opcionalmente una diacilglicerol aciltransferasa

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, caracterizada por una o más o todas las siguientes propiedades:

- 60 a) la eficacia de conversión de ALA en EPA, DPA o DHA es de al menos 17,3 % o de al menos 23 %,
- b) la eficacia de conversión de ALA en DPA o DHA es de al menos 15,4 % o de al menos 21 %,
- c) la eficacia de conversión de ALA en DHA es de al menos 9,5 % o de al menos 10,8 %, y
- 65 d) la eficacia de conversión de EPA en DHA es de al menos 45 % o de al menos 50 %, y preferentemente se caracteriza además por que al menos un 4 % de los ácidos grasos totales en la célula es DHA.

Preferentemente, al menos 6 %, al menos 11 % o al menos 15 % de los ácidos grasos totales incorporados en el triacilglicerol en la célula es DHA.

5 En una realización, DHA constituye un 20-65 %, preferentemente un 40-65 %, del total de SDA, ETA, EPA, DPA y DHA en la célula.

10 Preferentemente, entre los ácidos grasos  $\omega$ 3 en la célula, un 0,1-25 % es SDA, un 0,1-10 % es ETA, un 0,1-60 % es EPA, un 0,1-50 % es DPA y un 30-95 % es DHA, más preferentemente de los ácidos grasos  $\omega$ 3 en la célula un 0,1-25 % es SDA, un 0,1-10 % es ETA, un 0,1-50 % es EPA, un 0,1-50 % es DPA y un 40-95 % es DHA.

15 La  $\Delta$ 4 desaturasa comprende preferentemente aminoácidos que tienen una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:73, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:73.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende polinucleótidos exógenos que codifican;

- 20 i) una  $\Delta$ 6 elongasa y/o una  $\Delta$ 9 elongasa,  
ii) una  $\Delta$ 6 desaturasa y/o una  $\Delta$ 8 desaturasa,  
iii) una  $\Delta$ 5 desaturasa,  
iv) una  $\Delta$ 5 elongasa, y  
v) opcionalmente una diacilglicerol aciltransferasa

25 en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, caracterizada por una o más o todas las siguientes propiedades:

- a) la eficacia de conversión de ALA en EPA o DPA es de al menos 17,3 % o de al menos 23 %, y  
b) la eficacia de conversión de ALA en DPA es de al menos 15,4 % o de al menos 21 %, y

30 y preferentemente se caracteriza además por que al menos un 4 % de los ácidos grasos totales en la célula es DPA.

Preferentemente, al menos un 6 %, al menos un 11 % o al menos un 15 % de los ácidos grasos totales incorporados en el triacilglicerol en la célula es DPA.

35 El DPA constituye preferentemente un 20-65 %, más preferentemente un 40-65 %, del total de SDA, ETA, EPA y DPA en la célula.

40 Preferentemente, entre los ácidos grasos  $\omega$ 3 en la célula un 0,1-35 % es SDA, un 0,1-15 % es ETA, un 0,1-60 % es EPA y un 30-75 % es DPA, más preferentemente entre los  $\omega$ 3 ácidos grasos en la célula un 0,1-35 % es SDA, un 0,1-15 % es ETA, un 0,1-50 % es EPA y un 40-75 % es DPA.

45 En una realización, la  $\Delta$ 6 elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:4, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la SEQ ID NO:4.

En otra realización, la  $\Delta$ 6 desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:8, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 67 % idéntica a la SEQ ID NO:8.

50 En una realización, la  $\Delta$ 5 desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:26, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:26.

55 En otra realización más, la  $\Delta$ 5 elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:6, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6.

60 En una realización, la diacilglicerol aciltransferasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:75 o la SEQ ID NO:108, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:75 y/o a la SEQ ID NO:108.

Las combinaciones de cualesquiera dos, tres, cuatro o todas las enzimas anteriores están claramente incluidas en la invención.

65 En otra realización más, la célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas

de una planta, de la invención comprende además polinucleótidos exógenos que codifican;

- i) una  $\Delta 17$  desaturasa,
- ii) una  $\Delta 15$  desaturasa, y/o
- iii) una  $\Delta 12$  desaturasa

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

En una realización adicional, una o más o todas las desaturasas expresadas a partir de los polinucleótidos exógenos en la célula de la invención tienen una mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que el correspondiente sustrato de acil-PC. En un aspecto particular, la  $\Delta 6$  desaturasa y la  $\Delta 5$  desaturasa, la  $\Delta 5$  desaturasa y la  $\Delta 4$  desaturasa, la  $\Delta 6$  desaturasa y la  $\Delta 4$  desaturasa, o las tres  $\Delta 6$  desaturasa,  $\Delta 5$  desaturasa y  $\Delta 4$  desaturasa, o además de cada una de estas combinaciones cualquiera entre la  $\Delta 17$  desaturasa, la  $\Delta 15$  desaturasa y/o la  $\Delta 12$  desaturasa tienen una mayor actividad sobre sus sustratos de acil-CoA que los correspondientes sustratos de acil-PC. En esta forma de realización, las otras desaturasas expresadas a partir de polinucleótidos exógenos en la célula pueden tener, o no, una mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que el correspondiente sustrato de acil-PC. Como se podrá apreciar, el sustrato preferido de acil-CoA para cada enzima es diferente.

La presente invención proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso elongasa con actividad  $\Delta 6$  elongasa y  $\Delta 9$  elongasa, en donde la elongasa tiene una mayor actividad  $\Delta 6$  elongasa que actividad  $\Delta 9$  elongasa.

En un aspecto, la elongasa tiene una eficacia de conversión sobre SDA para producir ETA que es de al menos un 50 % o de al menos un 60 %, y/o una eficacia de conversión sobre ALA para producir ETrA que es de al menos un 6 % o de al menos un 9 %.

Preferentemente, la elongasa tiene al menos 6,5 veces aproximadamente más actividad  $\Delta 6$  elongasa que actividad  $\Delta 9$  elongasa.

En otro aspecto más, la elongasa no tiene una actividad  $\Delta 5$  elongasa detectable.

La elongasa comprende preferentemente aminoácidos que tienen una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:4, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la SEQ ID NO:4.

En otro aspecto más, la célula comprende además polinucleótidos exógenos que codifican;

- i) una  $\Delta 8$  desaturasa y/o una  $\Delta 6$  desaturasa,
- ii) una  $\Delta 5$  desaturasa,
- iii) una  $\Delta 5$  elongasa, y
- iv) opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

La presente memoria descriptiva proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso desaturasa con actividad  $\Delta 5$  desaturasa, en donde la desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 53 % idéntica a la SEQ ID NO:13.

La presente memoria descriptiva proporciona además una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso elongasa con actividad  $\Delta 9$  elongasa, en donde la elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se provee en cualquiera de las SEQ ID NO:28, 94 y 96, un fragmento biológicamente activo de la misma, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 81 % idéntica a la SEQ ID NO:28 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94 y/o a la SEQ ID NO:96.

En un aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:94 o en la SEQ ID NO:96, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94 y/o a la SEQ ID NO:96, y en donde la elongasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 6$  que el correspondiente sustrato  $\omega 3$ . Más preferentemente, la  $\Delta 9$  elongasa tiene una actividad al menos 2

veces, más preferentemente al menos 4 veces mayor sobre un sustrato  $\omega 6$  (por ejemplo, LA) que el correspondiente sustrato  $\omega 3$  (por ejemplo, ALA).

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula recombinante que comprende un polinucleótido exógeno que codifica una diacilglicerol aciltransferasa, en donde dicha diacilglicerol aciltransferasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:108, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 54 % idéntica a la SEQ ID NO:108.

10 En un aspecto de la célula de acuerdo con la invención, la desaturasa y/o elongasa, o múltiples desaturasas y/o elongasas, se pueden purificar a partir de algas microscópicas. Las algas microscópicas preferidas son *Pavlova* spp, *Pyramimonas* spp y *Micromonas* spp.

15 En una realización preferida, la célula de acuerdo con la invención es una célula eucariota. Por ejemplo, la célula puede ser una célula vegetal, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula fúngica o una célula de levadura. La célula puede ser una célula en cultivo tisular, *in vitro* y/o aislada.

20 En una realización, la célula se encuentra en una planta y/o es una célula madura de la semilla de una planta. La planta se puede encontrar en el campo o puede estar cosechada como una parte de planta o la semilla puede ser una semilla cosechada.

En una realización particular, la planta o semilla de planta es una planta oleaginosa o una semilla oleaginosa, respectivamente.

25 Como podrá apreciar el experto en la materia, una o más de las elongasas y/o desaturasas definidas pueden coexpresarse en la misma célula.

En una realización adicional, la célula de la invención tiene la capacidad de sintetizar ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), en donde la célula deriva de una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA.

30 Los inventores de la presente invención también han descubierto que la coexpresión de un supresor por silenciamiento puede mejorar los niveles de enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos en células vegetales, en particular sobre generaciones repetidas a partir de la planta transformada inicialmente. Por consiguiente, en una realización preferida, una célula de la invención, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de un órgano de almacenamiento de una planta o una célula de las semillas, comprende un polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento.

35 Preferentemente, el polinucleótido exógeno que codifica al supresor por silenciamiento está ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta. En un aspecto, el promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta es un promotor específico de semillas o un promotor específico de cotiledones o un promotor específico del endosperma que se expresa preferencialmente en la semilla en desarrollo.

40 La presente memoria descriptiva proporciona además un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

- 45
- a) introducir en una célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, un polinucleótido exógeno que codifica una actividad ácido graso  $\omega 3$  desaturasa, en donde dicho polinucleótido está ligado operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicho polinucleótido en la célula,
  - 50 b) expresar los polinucleótidos exógenos en la célula,
  - c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y
  - d) seleccionar una célula capaz de desaturar al menos uno entre ARA en EPA, DGLA en ETA, GLA en SDA, ambos ARA en EPA y DGLA en ETA, ambos ARA en EPA y GLA en SDA, o las tres combinaciones.

55 En un aspecto, la célula seleccionada es una célula de acuerdo con la invención. En particular, la célula puede comprender además una combinación de desaturasas y elongasas como se describe en la presente.

La presente memoria descriptiva proporciona además un método para sintetizar DPA, comprendiendo el método:

- 60
- a) introducir en células que no son capaces de sintetizar DPA polinucleósidos exógenos que comprenden:
    - 65 i) una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa, en la que la  $\Delta 5$  elongasa comprende aminoácidos con la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6,
    - ii) una  $\Delta 8$  desaturasa,
    - iii) una  $\Delta 9$  elongasa y/o una  $\Delta 6$  elongasa,

- iv) una  $\Delta 5$  desaturasa, y
- v) opcionalmente, una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

- b) expresar los polinucleótidos exógenos en las células y,
- c) seleccionar células en las que, basándose en la composición de ácido graso, la  $\Delta 5$  elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos 70 % y;
- d) extraer un aceite que comprende DPA de las células seleccionadas.

En una realización del método de la invención, la célula seleccionada es una célula de acuerdo con la invención. En particular, la célula puede comprender además una combinación de desaturasas y elongasas como se describe en el presente documento.

La presente memoria descriptiva proporciona además un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

- a) introducir en una célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso  $\Delta 5$  elongasa en donde el polinucleótido está ligado operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicho polinucleótido en la célula,
- b) expresar el polinucleótido exógeno en la célula,
- c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y
- d) seleccionar una célula que tiene al menos dos, preferiblemente las tres, características siguientes

- i) más actividad  $\Delta 6$  desaturasa sobre ALA que LA como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal,
- ii) más actividad  $\Delta 6$  desaturasa sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unida a la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal,
- iii) actividad  $\Delta 6$  desaturasa sobre ALA y  $\Delta 8$  desaturasa sobre ETrA, preferentemente en una célula vegetal,

La presente invención proporciona además un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

- a) introducir en una célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, un polinucleótido exógeno que codifica un ácido graso  $\Delta 6$  desaturasa en donde el polinucleótido está ligado operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicho polinucleótido en la célula,
- b) expresar el polinucleótido exógeno en la célula,
- c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y
- d) seleccionar una célula con actividad  $\Delta 6$  desaturasa que tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 3$  que el correspondiente sustrato  $\omega 6$ , y con actividad sobre ALA para producir SDA con una eficacia de al menos 5 %, al menos 7,5 % o al menos 10 % o al menos 35 % cuando se expresa en una célula de levadura.

En un aspecto, la célula seleccionada es una célula descrita en el presente documento. En particular, la célula puede comprender además una combinación de desaturasas y elongasas como se describe en la presente.

La presente invención proporciona además un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

- a) introducir en la célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, polinucleótidos exógenos que codifican;
  - i) una  $\Delta 9$  elongasa,
  - ii) una  $\Delta 8$  desaturasa,
  - iii) una  $\Delta 5$  desaturasa,
  - iv) opcionalmente una  $\Delta 5$  elongasa, y
  - v) si la  $\Delta 5$  elongasa está presente, opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa,

en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

- b) expresar los polinucleótidos exógenos en la célula;
- c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y

d) seleccionar una célula donde al menos un 15 %, al menos un 20 % o al menos un 25 % de los ácidos grasos totales comprenden al menos 20 carbonos y al menos 3 dobles enlaces carbono-carbono en sus cadenas de acilos.

5 En un aspecto, la célula seleccionada es una célula descrita en el presente documento.

La presente memoria descriptiva proporciona además un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

10 a) introducir en la célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, polinucleótidos exógenos que codifican;

- 15 i) una  $\Delta 6$  elongasa y/o una  $\Delta 9$  elongasa,  
 ii) una  $\Delta 6$  desaturasa y/o una  $\Delta 8$  desaturasa,  
 iii) una  $\Delta 5$  desaturasa,  
 iv) una  $\Delta 5$  elongasa,  
 v) una  $\Delta 4$  desaturasa, y  
 vi) opcionalmente una diacilglicerol aciltransferasa,

20 en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

- 25 b) expresar los polinucleótidos exógenos en la célula;  
 c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y  
 d) seleccionar una célula caracterizada por o más o todas las siguientes propiedades:

- 30 1) la eficacia de conversión de ALA en EPA, DPA o DHA es de al menos 17,3 % o de al menos 23 %;  
 2) la eficacia de conversión de ALA en DPA o DHA es de al menos 15,4 % o de al menos 21 %;  
 3) la eficacia de conversión de ALA en DHA es de al menos 9,5 % o de al menos 10,8 %; y  
 4) la eficacia de conversión de EPA en DHA es de al menos 45 % o de al menos 50 %;

y preferentemente se caracteriza además por que al menos un 4 % de los ácidos grasos totales en la célula es DHA.

35 En un aspecto adicional, la presente memoria descriptiva proporciona un método para obtener una célula, preferentemente una célula vegetal y más preferentemente una célula de semillas de una planta, capaz de sintetizar uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA), comprendiendo el método

40 a) introducir en la célula, preferentemente una célula que no puede sintetizar dichos LC-PUFA, polinucleótidos exógenos que codifican;

- 45 i) una  $\Delta 6$  elongasa y/o una  $\Delta 9$  elongasa,  
 ii) una  $\Delta 6$  desaturasa y/o una  $\Delta 8$  desaturasa,  
 iii) una  $\Delta 5$  desaturasa,  
 iv) una  $\Delta 5$  elongasa, y  
 v) opcionalmente una diacilglicerol aciltransferasa

50 en donde cada polinucleótido está ligado operativamente a uno o más promotores capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

- b) expresar los polinucleótidos exógenos en la célula;  
 c) analizar la composición de ácidos grasos de la célula, y  
 d) seleccionar una célula caracterizada por o más o todas las siguientes propiedades:

- 55 a) la eficacia de conversión de ALA en EPA o DPA es de al menos 17,3 % o de al menos 23 %, y  
 b) la eficacia de conversión de ALA en DPA es de al menos 15,4 % o de al menos 21 %,

y preferentemente se caracteriza además por que al menos un 4 % de los ácidos grasos totales en la célula es DPA.

60 En una realización del método de acuerdo con la invención, los polinucleótidos exógenos se integran de forma estable en el genoma de la célula.

En otra realización, el método comprende además el paso de regenerar una planta transformada a partir de la célula del paso a).

65

En un aspecto adicional, el o los polinucleótidos exógenos se expresan de forma transitoria en la célula.

En un aspecto, la célula es una célula de una hoja en una planta.

5 La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos que comprende:

- i) obtener una molécula de ácido nucleico ligado operativamente a un promotor, donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que puede ser una ácido graso desaturasa;
- 10 ii) introducir la molécula de ácido nucleico en una célula en la cual el promotor es activo;
- iii) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula;
- iv) analizar la composición de ácidos grasos de la célula; y
- v) seleccionar la molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos sobre la base que el polipéptido tiene actividad  $\omega$ 3 desaturasa y tiene la capacidad de desaturar al menos uno entre ARA en EPA, DGLA en ETA, GLA en SDA, ambos ARA en EPA y DGLA en ETA, ambos ARA en EPA y GLA en SDA, o las tres opciones.

En un aspecto del proceso, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos 35 % idéntica a la SEQ ID NO:15, al menos 60 % idéntica a la SEQ ID NO:17 y/o al menos 60 % idéntica a la SEQ ID NO:20.

20 La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la elongación de ácidos grasos que comprende:

- i) obtener una molécula de ácido nucleico ligado operativamente a un promotor, donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que puede ser una ácido graso elongasa;
- 25 ii) introducir la molécula de ácido nucleico en una célula en la cual el promotor es activo,
- iii) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula;
- iv) analizar la composición de ácidos grasos de la célula; y
- v) seleccionar la molécula de ácido nucleico relacionada con la elongación de ácidos grasos sobre la base que el polipéptido tiene actividad  $\Delta$ 5 elongasa y una eficacia de conversión sobre EPA para producir DPA que es de al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 % o al menos un 75 %.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos un 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6.

35 La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos que comprende:

- i) obtener una molécula de ácido nucleico ligado operativamente a un promotor, donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que puede ser una ácido graso desaturasa,
- 40 ii) introducir la molécula de ácido nucleico en una célula en la cual el promotor es activo,
- iii) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula;
- iv) analizar la composición de ácidos grasos de la célula; y
- v) seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos sobre la base que el polipéptido tiene actividad  $\Delta$ 6 desaturasa y al menos dos, preferentemente los tres, de los siguientes:
- 45 a) mayor actividad desaturasa  $\Delta$ 6 sobre ALA que LA como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal,
- b) mayor actividad desaturasa  $\Delta$ 6 sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal, y
- 50 c) actividad  $\Delta$ 8 desaturasa sobre ALA, preferentemente en una célula vegetal.

En un aspecto del proceso, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos un 77 % idéntica a la SEQ ID NO:10 y/o es al menos un 67 % idéntica a la SEQ ID NO:8.

55 La presente memoria descriptiva proporciona además un proceso para seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos que comprende:

- i) obtener una molécula de ácido nucleico ligado operativamente a un promotor, donde la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que puede ser una ácido graso desaturasa,
- 60 ii) introducir la molécula de ácido nucleico en una célula en la cual el promotor es activo,
- iii) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula;
- iv) analizar la composición de ácidos grasos de la célula; y
- v) seleccionar una molécula de ácido nucleico relacionada con la desaturación de ácidos grasos sobre la base que el polipéptido tiene ambas actividades  $\Delta$ 6 desaturasa y  $\Delta$ 8 desaturasa.

65

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos un 67 % idéntica a la SEQ ID NO:8.

En un aspecto adicional, el paso (v) del proceso de la invención comprende seleccionar una molécula de ácido nucleico que codifica una desaturasa activa sobre sustratos de acil-CoA o una desaturasa *front-end*.

La presente memoria descriptiva proporciona además una combinación de polinucleótidos exógenos definidos en el presente documento cuando se usa para producir una célula recombinante, expresar una combinación de al menos dos ácido graso desaturasas y dos ácido graso elongasas en una célula recombinante y/o para producir LC-PUFA en una célula recombinante.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\Delta 5$  elongasa sustancialmente purificada y/o recombinante, en donde la elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 % o al menos un 75 % cuando se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula.

En un aspecto, la  $\Delta 5$  elongasa se caracteriza por una o más de las propiedades definidas en la presente.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\omega 3$  desaturasa sustancialmente purificada y/o recombinante que tiene la capacidad de desaturar al menos uno entre ARA en EPA, DGLA en ETA, GLA en SDA, ambos ARA en EPA y DGLA en ETA, ambos ARA en EPA y GLA en SDA, o las tres opciones cuando se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula.

En un aspecto, la  $\omega 3$  desaturasa de la invención se caracteriza por presentar cualquiera entre una o más de las propiedades definidas en la presente.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\Delta 6$  desaturasa sustancialmente purificada y/o recombinante, en donde la desaturasa se caracteriza además por presentar al menos dos, preferentemente los tres, de lo siguiente;

- i) mayor actividad desaturasa  $\Delta 6$  sobre ALA que LA como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal,
- ii) mayor actividad desaturasa  $\Delta 6$  sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso, preferentemente en una célula vegetal, y
- iii) actividad desaturasa  $\Delta 8$  sobre ETrA, preferentemente en una célula vegetal.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\Delta 6$  desaturasa sustancialmente purificada y/o recombinante, en donde la desaturasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 3$  que el correspondiente sustrato  $\omega 6$ , y en donde la desaturasa tiene actividad sobre ALA para producir SDA con una eficacia de al menos un 5 %, al menos un 7,5 % o al menos un 10 % cuando la desaturasa se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula, o de al menos un 35 % cuando se expresa en una célula de levadura.

En un aspecto, la  $\Delta 6$  desaturasa de la invención se caracteriza por presentar cualquiera entre una o más de las propiedades definidas en la presente.

La presente memoria descriptiva proporciona además los ácidos grasos  $\Delta 6$  elongasa y  $\Delta 9$  elongasa sustancialmente purificadas y/o recombinantes, en donde la elongasa tiene mayor actividad  $\Delta 6$  elongasa que actividad  $\Delta 9$  elongasa.

En un aspecto, la  $\Delta 6$  elongasa y la  $\Delta 9$  elongasa de la invención se caracterizan por presentar cualquiera entre una o más de las propiedades definidas en la presente.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\Delta 5$  desaturasa sustancialmente purificada y/o recombinante que comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 53 % idéntica a la SEQ ID NO:13.

La presente memoria descriptiva proporciona además una ácido graso  $\Delta 9$  elongasa sustancialmente purificada y/o recombinante que comprende aminoácidos que tienen la secuencia proporcionada en cualquiera de las SEQ ID NO:28, 94 y 96, un fragmento biológicamente activo de la misma, una secuencia de aminoácidos que es al menos 81 % idéntica a la SEQ ID NO:28 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94 y/o a la SEQ ID NO:96.

En un aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:94 o en la SEQ ID NO:96, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94 y/o a la SEQ ID NO:96, y en donde la elongasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 6$  que el correspondiente sustrato  $\omega 3$ .

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona una diacilglicerol aciltransferasa sustancialmente purificada y/o recombinante que comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:108, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 54 % idéntica a la SEQ ID NO:108.

5 En un aspecto, la desaturasa o elongasa de acuerdo con la invención se puede purificar a partir de algas microscópicas. Las algas microscópicas preferidas son *Pavlova* spp, *Pyramimonas* spp y *Micromonas* spp.

La presente memoria descriptiva proporciona además un polinucleótido aislado y/o exógeno que comprende:

- 10 i) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 o 125 a 129,  
 ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una desaturasa o una elongasa de acuerdo con la invención,  
 15 iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 50 % idéntica a una o más de las secuencias indicadas en las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 o 125 a 129 y/o  
 iv) una secuencia que se hibrida con cualquiera de i) a iii) bajo condiciones severas.

20 En un aspecto, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 57 % idéntica a la SEQ ID NO:3 y/o a la SEQ ID NO:126, y codifica una  $\Delta 6$  elongasa.

En otro aspecto, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:14, a la SEQ ID NO:16, a la SEQ ID NO:18 y/o a la SEQ ID NO:19, y codifica una  $\omega 3$  desaturasa.

25 En otro aspecto, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:5 y/o a la SEQ ID NO:128, y codifica una  $\Delta 5$  elongasa.

30 En un aspecto, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 % idéntica a la SEQ ID NO:7, a la SEQ ID NO:9, a la SEQ ID NO:11 y/o a la SEQ ID NO:125, y codifica una  $\Delta 6$  desaturasa.

En otro aspecto más, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 % idéntica a la SEQ ID NO:12, y codifica una  $\Delta 5$  desaturasa.

35 En otro aspecto, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:27, a la SEQ ID NO:29, a la SEQ ID NO:93 y/o a la SEQ ID NO:96, y codifica una  $\Delta 9$  elongasa.

40 En otro aspecto más, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 % idéntica a la SEQ ID NO:107, y codifica una diacilglicerol aciltransferasa.

45 En un aspecto particular, el polinucleótido aislado y/o exógeno es al menos un 80 % o al menos un 90 % o al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a una de las secuencias indicadas en las SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 27, 29, 93, 95, 107 o 125 a 129.

50 La presente memoria descriptiva proporciona además una construcción de ADN para su integración, y/o integrada, en el genoma de una célula vegetal, donde dicha construcción comprende una agrupación de al menos tres marcos de lectura abiertos que codifican proteínas que modulan la síntesis de ácidos grasos en la célula vegetal, preferentemente cada proteína es un ácido graso desaturasa o un ácido graso elongasa, en donde cada marco de lectura abierto que tiene la misma orientación de transcripción está separada por al menos 750 bp, al menos 1.000 bp o al menos 1.250 bp, y al menos dos de los marcos de lectura abiertos tienen diferentes orientaciones de transcripción, en donde cada marco de lectura abierto está ligado operativamente a un promotor que es activo en la célula vegetal y cada promotor puede, de manera independiente, ser igual o diferente.

55 Preferentemente, al menos dos de los promotores presentes en la construcción de ADN son diferentes.

60 Uno o más de cada marco de lectura abierto está ligado operativamente a una secuencia directriz 5' heteróloga, cada una de las cuales puede ser, de forma independiente, igual o diferente, en donde cada secuencia directriz 5' heteróloga mejora la eficacia de la traducción con relación a natural secuencia directriz 5' natural para el marco de lectura abierto particular.

En la construcción de ADN, la secuencia directriz heteróloga 5' es preferentemente una secuencia directriz 5' del virus en mosaico del tabaco (TMV).

65 En la construcción de ADN, las proteínas son preferentemente elongasas y/o desaturasas, más preferentemente una

combinación como se describe en el presente documento.

En otro aspecto más, la construcción de ADN de acuerdo con la invención contiene solamente tres o cuatro marcos de lectura abiertos que se traducen a proteínas.

5 La presente memoria descriptiva proporciona además un vector que comprende el polinucleótido que se describe en el presente documento y/o a la construcción de ADN que se describe en el presente documento.

Preferentemente, el polinucleótido está ligado operativamente a un promotor.

10 La presente memoria descriptiva proporciona además un método de producción de la desaturasa o elongasa que se describe en el presente documento, comprendiendo el método expresar en una célula o sistema de expresión no celular el polinucleótido de la invención, la construcción de ADN de la invención y/o el vector que se describe en el presente documento.

15 Los inventores de la presente invención también han descubierto sorprendentemente que se pueden transfectar transitoriamente al menos tres ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos independientes que comprenden diferentes polinucleótidos exógenos en una célula eucariota y luego se puede detectar la actividad de cada polinucleótido exógeno en la célula, en combinación. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona además un método para transfectar transitoriamente una célula eucariota con al menos tres polinucleótidos exógenos diferentes, comprendiendo el método

i) obtener al menos

25 a) una primera bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un primer polinucleótido exógeno,  
 b) una segunda bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende a segundo polinucleótido exógeno, y  
 30 c) una tercera bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un tercer polinucleótido exógeno, y

ii) poner la célula en contacto con las bacterias del paso i),

35 en donde cada uno de los ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos se transfiere desde la bacteria a la célula para producir la célula transfectada transitoriamente, en donde cada uno de los polinucleótidos exógenos comprende un promotor que es activo en la célula, en donde cada promotor puede ser, de forma independiente, igual o diferente, y en donde al menos uno de los polinucleótidos exógenos codifica un supresor por silenciamiento.

40 El paso ii) se puede realizar sucesiva o simultáneamente con una o más de las bacterias. Por ejemplo, la célula se puede poner en contacto con la primera bacteria, luego con la segunda bacteria y así sucesivamente. En otro ejemplo, la célula se pone en contacto con cada bacteria al mismo tiempo, preferentemente como una mezcla de las bacterias. Se pueden variar las concentraciones de las diferentes bacterias entre sí o pueden ser iguales o similares. Las bacterias pueden ser formas aisladas agrupadas que comprenden, por ejemplo, una cantidad de formas aisladas de una biblioteca de cepas.

45 En un aspecto, el método comprende además obtener, y luego poner en contacto la célula con una o más bacterias adicionales, cada una de las cuales comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende polinucleótidos exógenos diferentes. Por ejemplo, en un aspecto, el método comprende obtener y luego poner en contacto la célula con una cuarta bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un cuarto polinucleótido exógeno. En un aspecto adicional, el método comprende obtener y luego poner en contacto la célula con una quinta bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un quinto polinucleótido exógeno. En un aspecto adicional, el método comprende obtener y luego poner en contacto la célula con una sexta bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un sexto polinucleótido exógeno. En un aspecto adicional, el método comprende obtener y luego poner en contacto la célula con una séptima bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un séptimo polinucleótido exógeno. En otro aspecto más adicional, el método comprende obtener y luego poner en contacto la célula con una octava bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un octavo polinucleótido exógeno.

60 Preferentemente, los polinucleótidos exógenos diferentes codifican diferentes moléculas de ARN y/o polipéptidos.

En un aspecto, cada polinucleótido exógeno codifica una enzima que forma parte de una vía enzimática o es un candidato para una enzima tal.

65

El aspecto anterior es de particular utilidad para estudiar polinucleótidos y/o polipéptidos que forman vías biológicas grandes y/o complejas. Por lo tanto, En un aspecto preferido, cada polinucleótido exógeno codifica una enzima, o es un candidato de una enzima tal, relacionada con la síntesis de ácidos grasos, modificación de ácidos grasos, ensamblaje de diacilglicerol, ensamblaje triacilglicerol o una combinación de dos o más de los mismos.

En un aspecto, una o más de las bacterias se encuentran en la forma de un protoplasto. Los ejemplos de bacterias de utilidad para la invención incluyen, pero en un sentido no limitativo, *Agrobacterium sp.*, *Rhizobium sp.*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mezorhizobium loti*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*.

Los ejemplos de ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos de utilidad para la invención incluyen, pero en un sentido no limitativo, ADN-P, ADN-T de *Agrobacterium sp.* o una combinación de los mismos.

Preferentemente, la célula del aspecto anterior es una célula vegetal o una célula de mamífero. En un aspecto, la célula forma parte de un tejido u órgano. En otro aspecto, la célula es una célula vegetal y el tejido u órgano es una hoja, tallo, raíz, meristema, callo u óvulo.

Los inventores de la presente invención también han determinado que cuando los promotores son promotores específicos de semillas, la expresión de los polinucleótidos exógenos en las células de hojas puede mejorar por coexpresión de un factor de transcripción específico de semillas, tal como *leafy cotyledon 2*, *fusca3* o *abscisic acid-sensitive3*. Los ejemplos de proteínas *leafy cotyledon 2* incluyen, pero en un sentido no limitativo, los que se describen en el documento WO 01/70777. Por consiguiente, en un aspecto preferido, la célula vegetal es una célula vegetal de una hoja, al menos uno de los promotores es un promotor específico de semillas y al menos uno de los polinucleótidos exógenos codifica un factor de la transcripción específica de semillas, tal como *leafy cotyledon 2*.

En un aspecto, ninguno de los polinucleótidos exógenos es un gen vírico. En una realización, uno o más de los polinucleótidos exógenos solamente están presentes en el ácido nucleico de transferencia extracromosómico como una sola copia, no como un multímero o multímero parcial de una secuencia de ácido nucleico definida. En un aspecto adicional, al menos uno de los ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos no comprende un origen de replicación que es funcional en la célula, preferentemente no un origen de replicación vírico y más preferentemente no es el origen de replicación FBNYV. En un aspecto adicional, ninguno de los polinucleótidos exógenos codifica una replicasa vírico o una proteína de movimiento vírico tales como los que se describen en el documento WO 07/137788 y en Marillonnet et al. (2005).

También se proporciona un método de selección de una célula transfectada transitoriamente según una actividad deseada, comprendiendo el método aplicar el método para transfectar transitoriamente una célula eucariota con al menos tres polinucleótidos exógenos de la invención, y evaluar la célula por la actividad deseada.

Los inventores de la presente invención también identificaron que se puede mejorar la transformación de células, en particular de células vegetales, con más de seis genes diferentes proporcionando los genes por medio de diferentes ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos. Por consiguiente, en otro aspecto la presente memoria descriptiva proporciona un método para transformar una célula eucariota con al menos seis polinucleótidos exógenos diferentes, comprendiendo el método

i) obtener al menos

a) una primera bacteria que comprende un primer ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes, y

b) una segunda bacteria que comprende un segundo ácido nucleico de transferencia extracromosómico diferente del primero que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,

ii) poner la célula en contacto con la bacteria del paso i), y

iii) opcionalmente, seleccionar una célula transformada de forma estable con los polinucleótidos exógenos del primer y segundo ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos,

en donde cada uno de los polinucleótidos exógenos del primer y segundo ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos se transfieren desde la bacteria a la célula para producir la célula transformada, en donde cada uno de los polinucleótidos exógenos comprende un promotor que es activo en la célula o en una célula derivable de la misma, y en donde cada promotor puede ser, de forma independiente, igual o diferente.

Los pasos i)a) y i)b) se pueden aplicar sucesiva o simultáneamente con las dos bacterias. Por ejemplo, la célula se puede poner en contacto con la primera bacteria y luego con la segunda bacteria. La célula que estuvo en contacto con la segunda bacteria puede ser una célula de la progenie o derivada de la célula que estuvo en contacto con la primera bacteria. En otro ejemplo, la célula está en contacto con ambas bacterias al mismo tiempo.

- 5 En un aspecto, i) el primer ácido nucleico de transferencia extracromosómico, tiene solamente tres a seis, solamente tres a cinco, solamente tres a cuatro, solamente cuatro a seis, solamente cuatro a cinco o solamente cinco a seis polinucleótidos exógenos diferentes, y ii) el segundo ácido nucleico de transferencia extracromosómico, tiene solamente tres a seis, solamente tres a cinco, solamente tres a cuatro, solamente cuatro a seis, solamente cuatro a cinco o solamente cinco a seis polinucleótidos exógenos diferentes.
- Preferentemente, cada uno de los polinucleótidos exógenos codifica polipéptidos, y cada uno de los polipéptidos es diferente.
- 10 En un aspecto adicional,
- i) el primer ácido nucleico de transferencia extracromosómico comprende dos polinucleótidos exógenos que codifican, de forma independiente, polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de una  $\Delta 6$  desaturasa, una  $\Delta 12$  desaturasa y una  $\Delta 15$  desaturasa, y
- 15 ii) el segundo ácido nucleico de transferencia extracromosómico comprende un polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido que es la tercera enzima del grupo.
- Preferentemente, la célula es una célula vegetal y el método comprende además el paso de generar una planta transformada a partir de la célula transformada de forma estable.
- 20 También se proporciona una célula producida según el método de transfectar transitoriamente una célula eucariota con al menos tres polinucleótidos exógenos de la invención, o mediante el método para transformar una célula eucariota con al menos seis polinucleótidos exógenos diferentes de la invención.
- 25 En otro aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método de producción de una planta transformada de forma estable con al menos seis polinucleótidos exógenos diferentes, comprendiendo el método
- i) obtener una primera planta transformada de forma estable que comprende una primera región genómica exógena que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- 30 ii) obtener una segunda planta transformada de forma estable de una especie sexualmente compatible con la primera y que comprende una segunda región genómica exógena diferente de la primera que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- iii) cruzar la primera planta transformada de forma estable con la segunda planta transformada de forma estable, y
- 35 iv) seleccionar una planta producida en el paso iii) o una progenie de la misma que comprende a la primera y segunda regiones genómicas, produciendo así la planta transformada de forma estable,
- en donde cada uno de los polinucleótidos exógenos comprende un promotor que es activo en la planta, y en donde cada promotor se puede ser, de forma independiente, igual o diferente.
- 40 En un aspecto preferido, los polinucleótidos exógenos de la primera y/o segunda regiones genómicas exógenas están orientados y separados como se indicó previamente para la construcción de ADN de la invención.
- 45 Cualquiera de las secuencias promotoras puede estar presente múltiples veces o se puede usar una sola vez dentro de la primera y segunda regiones genómicas exógenas, o se puede usar uno o más promotores múltiples veces y uno o más de los otros promotores se puede usar una sola vez en la primera y segunda regiones genómicas exógenas. Cada promotor vegetal puede ser, de forma independiente, preferencialmente activo en un tejido u órgano de la planta, tal como en las hojas o semillas, con relación a otros tejidos u órganos. Esto puede permitir la expresión simultánea, o la expresión superpuesta, de las tres regiones codificantes de proteínas introducidas en el
- 50 órgano o tejido vegetal. En un aspecto alternativa, uno o más promotores se expresan de forma constitutiva en la planta y uno o más de los otros promotores se expresan preferencialmente en el órgano o tejido vegetal.
- En un aspecto, el paso i) comprende producir la primera planta transformada de forma estable por
- 55 a) contacto de una célula vegetal con una primera bacteria que comprende un primer ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- b) generación de una planta transformada de forma estable a partir de la célula vegetal del paso a), y opcionalmente
- 60 c) producción de una planta de progenie a partir de la planta transformada de forma estable del paso b); y/o el paso ii) comprende producir la segunda planta transformada de forma estable por
- d) contacto de una célula vegetal con una segunda bacteria que comprende un segundo ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- e) generación de una planta transformada de forma estable a partir de la célula vegetal del paso d), y opcionalmente
- 65 f) producción de una planta de progenie a partir de la planta transformada de forma estable del paso e).

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona un método de producción de una planta transformada de forma estable con al menos seis polinucleótidos exógenos diferentes, comprendiendo el método

- 5 i) obtener una primera planta transformada de forma estable, o una parte de planta, que comprende una primera región genómica exógena que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- ii) poner en contacto una célula de la primera planta transformada de forma estable, o una parte de planta, con una bacteria que comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes,
- 10 iii) producir una planta a partir de la célula, y
- iv) opcionalmente, seleccionar una planta producida en el paso iii) que comprende dichos al menos seis polinucleótidos exógenos diferentes.

Con respecto al paso de “poner la célula en contacto con la bacteria del paso i)” de los aspectos anteriores, como comprenderá el experto en la materia, esto se hará durante un tiempo adecuado y en condiciones adecuadas para que los ácidos nucleicos de transferencia extracromosómicos puedan ser transferidos de las bacterias a la célula.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula eucariota que comprende al menos

- 20 a) un primer ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un primer polinucleótido exógeno,
- b) un segundo ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un segundo polinucleótido exógeno, y
- c) un tercer ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende un tercer polinucleótido exógeno.

En un aspecto, la célula comprende además una o más bacterias adicionales cada una de las cuales comprende un ácido nucleico de transferencia extracromosómico que comprende polinucleótidos exógenos diferentes.

También se proporciona una planta, o la progenie de la misma, o semillas que comprenden una primera región genómica exógena que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes, y una segunda región genómica exógena que comprende tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos exógenos diferentes. Los polinucleótidos exógenos de la o las regiones genómicas exógenas preferentemente están orientados y separados como se ha descrito previamente para la construcción de ADN.

La presente invención proporciona además un organismo no humano transgénico que comprende una célula de acuerdo con la invención. En un aspecto, cada célula del organismo es una célula de acuerdo con la invención.

Preferentemente, el organismo no humano transgénico es una planta transgénica, más preferentemente una planta transgénica oleaginosa para producir el aceite indicado más adelante. En una realización adicional, la planta transgénica comprende al menos un polinucleótido exógeno adicional que codifica un supresor por silenciamiento ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta, en donde la planta es fenotípicamente normal.

La presente invención proporciona además una semilla que comprende la célula de acuerdo con la invención o que se obtiene a partir de la planta transgénica de la invención.

La presente invención proporciona además un aceite que se obtiene de una célula vegetal o célula de levadura recombinante que sintetiza DPA, en la que dicha célula vegetal o célula de levadura recombinante comprende un polinucleótido exógeno que codifica una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa, en la que la elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos 70 % cuando la elongasa se expresa a partir del polinucleótido exógeno en la célula vegetal o de levadura, de forma que la suma de los porcentaje de DPA y DHA respecto de la suma de los porcentajes de EPA, DPA y DHA en el aceite es al menos 70 %.

En un aspecto, el aceite se obtiene por extracción del aceite de una semilla oleaginosa.

En un aspecto, el aceite es aceite de canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), aceite de mostaza (*Brassica juncea*), otros aceites de Brassica, aceite de girasol (*Helianthus annuus*), aceite de semillas de lino (*Linum usitatissimum*), aceite de soja (*Glycine max*), aceite de alazor (*Carthamus tinctorius*), aceite de maíz (*Zea mays*), aceite de tabaco (*Nicotiana tabacum*), aceite de maní (*Arachis hypogaea*), aceite de palma, aceite de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*), aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de palta (*Persea americana*), aceite de oliva (*Olea europaea*), aceite de nueces de Cayú (*Anacardium occidentale*), aceite de macadamia (*Macadamia intergrifolia*), aceite de almendras (*Prunus amygdalus*) o aceite de semillas de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

La presente memoria descriptiva proporciona un ácido graso producido, u obtenido, a partir de la célula de acuerdo con la invención, del organismo no humano transgénico de la invención y/o de la semilla de la invención.

65

La presente invención proporciona además un método de producción de una desaturasa, elongasa o diacilglicerol aciltransferasa, comprendiendo el método cultivar la célula recombinante, el organismo no humano transgénico y/o la semilla definidos para el aceite de la invención.

5 La presente invención proporciona además una composición que comprende una célula de acuerdo con la invención, la desaturasa o elongasa de acuerdo con la invención, un polinucleótido de acuerdo con la invención, una construcción de ADN de acuerdo con la invención, un vector de la invención, un aceite de acuerdo con la invención o un ácido graso de la invención.

10 La presente memoria descriptiva proporciona además alimentos, cosméticos o sustancias químicas que comprenden la célula recombinante, el organismo no humano transgénico y/o la semilla definidos para el aceite de la invención, el aceite de la invención y/o el ácido graso de la invención.

La presente invención proporciona además un método para conducir una reacción de desaturasa, comprendiendo el método poner un ácido graso poliinsaturado esterificado con CoA en contacto con la desaturasa de la invención.

15 La presente memoria descriptiva proporciona además un anticuerpo sustancialmente purificado, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a una desaturasa o elongasa de la invención.

20 La presente invención proporciona además el uso de la célula recombinante, del organismo no humano transgénico y/o de la semilla definidos para el aceite de la invención, el aceite de la invención, el ácido graso de la invención y/o el alimento de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una condición que podría obtener un beneficio de un PUFA.

25 En un realización, la dolencia es arritmia cardíaca, angioplastia, inflamación, asma, psoriasis, osteoporosis, cálculos renales, SIDA, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, cáncer, síndrome de alcohol fetal, trastorno de hiperactividad con déficit atencional, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistofia, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, diabetes, obesidad, mal de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, restenosis después de angioplastia, eczema, presión sanguínea elevada, agregación plaquetaria, hemorragia gastrointestinal, endometriosis, síndrome premenstrual, encefalomielitis miálgica, fatiga crónica después de infecciones víricas o una enfermedad ocular.

30 La presente invención proporciona además el uso de una célula de acuerdo con la invención, un organismo transgénico no humano de acuerdo con la invención, una semilla de acuerdo con la invención, un aceite de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una dolencia que se beneficiaría de un PUFA.

35 Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que es posible expresar los supresores por silenciamiento preferencialmente en los órganos de almacenamiento de una planta para aumentar los niveles de expresión transgénica en células vegetales sin afectar significativamente el desarrollo de una planta.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula vegetal que comprende

- 45 i) un primer polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento, ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta, y  
ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN, ligada operativamente a un promotor que dirige la transcripción de genes en el órgano de almacenamiento de una planta.

50 Preferentemente, el promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta es un promotor específico de semillas, tal como un promotor específico de cotiledones o un promotor específico del endosperma.

En un aspecto, el supresor por silenciamiento es una proteína supresora vírica tal como, pero en un sentido no limitativo, P1, P19, V2, P38, P15, Pe-Po y RPV-P0.

55 Normalmente, cuando la proteína supresora vírica se expresa constitutivamente en una planta, dicha planta es fenotípicamente anormal, pero cuando el supresor por silenciamiento se expresa específicamente en el órgano de almacenamiento, la planta es fenotípicamente normal. Los ejemplos de tales proteínas supresoras víricas incluyen, pero en un sentido no limitativo, P1, P19 y P15.

60 En un aspecto adicional, la proteína supresora vírica reduce la acumulación de microARN y/o el clivaje guiado de microARN.

La molécula de ARN puede ser funcional *per se* tal como, pero en un sentido no limitativo, un polinucleótido de sentido contrario, un polinucleótido catalítico, ARNcd y/o microARN. Como alternativa, la molécula de ARN puede codificar un polipéptido con una función deseada tal como, pero en un sentido no limitativo, una enzima relacionada con la síntesis o modificación de ácidos grasos, una proteína de almacenamiento en semillas tal como por ejemplo,

5 una glutenina o gliadina de cereales, una enzima relacionada con la síntesis o modificación de carbohidratos, el metabolismo secundario o un producto farmacéutico. Los ejemplos de proteínas farmacéuticas incluyen, pero en un sentido no limitativo, anticuerpos así como moléculas relacionadas con anticuerpos y fragmentos de los mismos, polipéptidos antigénicos que pueden proporcionar, por ejemplo, protección inmunológica contra cáncer, un agente infeccioso, una citoquina tal como, por ejemplo, un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, interferón- $\alpha$ , albúmina de suero humano y eritropoyetina.

10 En un aspecto adicional, la célula comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco o más polinucleótidos exógenos diferentes adicionales, cada uno de los cuales codifica una molécula de ARN y está ligado operativamente a un promotor que dirige la transcripción de genes en el órgano de almacenamiento. Cada polinucleótido exógeno puede estar ligado operativamente al mismo promotor, a promotores diferentes o una combinación de los mismos.

15 En un aspecto los polinucleótidos exógenos son ADN.

En un aspecto adicional, la célula se encuentra en un órgano de almacenamiento de una planta tal como una semilla.

20 En un aspecto preferido, la molécula de ARN está presente a un mayor nivel con relación a una célula isogénica que no contiene al primer polinucleótido exógeno. Preferentemente, el nivel está incrementado al menos un 10 %, al menos un 20 % y más preferentemente al menos un 30 %.

25 En otro aspecto, al menos una molécula de ARN codificada por al menos uno de los polinucleótidos exógenos adicionales está presente a un mayor nivel con relación a una célula isogénica que no contiene al primer polinucleótido exógeno.

30 También se proporciona una planta transgénica que comprende una célula del aspecto anterior. En un aspecto, cada célula de la planta es como se definió en el aspecto anterior. En un aspecto particularmente preferida, la planta es fenotípicamente normal en comparación con una planta que no contiene dicha célula.

En otro aspecto más se provee un órgano de almacenamiento de una planta que comprende una célula del aspecto anterior y/o que se obtiene de la planta transgénica definida precedentemente.

35 En un aspecto, el órgano de almacenamiento vegetal es una semilla.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para obtener una planta fenotípicamente normal que presenta mayores niveles de una molécula de ARN en su órgano de almacenamiento, que comprende

40 a) introducir en una célula vegetal

- i) un primer polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento, ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta, y
- ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN, ligada operativamente a un promotor que dirige la transcripción de genes en el órgano de almacenamiento de una planta,

45 b) regenerar una planta transformada a partir de la célula del paso a),

c) cultivar la planta transformada hasta que produzca órganos de almacenamiento,

d) determinar el nivel de la molécula de ARN en el órgano de almacenamiento, y

50 e) seleccionar una planta que es fenotípicamente normal, y en donde la molécula de ARN está presente a un mayor nivel en el órgano de almacenamiento con relación a un órgano de almacenamiento correspondiente que no contiene al primer polinucleótido exógeno.

55 En otro aspecto más adicional, se proporciona un método para obtener una planta fenotípicamente normal que presenta una expresión estabilizada de una molécula de ARN en su órgano de almacenamiento, que comprende

a) introducir en una célula vegetal

- i) un primer polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento, ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta, y
- ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN, ligada operativamente a un promotor que dirige la transcripción de genes en el órgano de almacenamiento de una planta,

60 b) regenerar una planta transformada a partir de la célula del paso a),

c) producir una planta de progenie de tercera generación que comprende el órgano de almacenamiento de la planta del paso b), y

65 d) seleccionar una planta de progenie de tercera generación en donde la molécula de ARN está presente en el

órgano de almacenamiento a un nivel que es al menos un 90 % del nivel en un órgano de almacenamiento de una generación anterior de la planta.

5 Preferentemente, los polinucleótidos exógenos de los aspectos anteriores están integrados de forma estable en el genoma de la célula.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para estabilizar la expresión de una molécula de ARN en un órgano de almacenamiento de una planta transgénica, que comprende

- 10 i) expresar un primer polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento, ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta, y  
 ii) expresar un segundo polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN ligada operativamente a un promotor que dirige la transcripción de genes en el órgano de almacenamiento de una planta,

15 en donde la planta transgénica es al menos una planta de progenie de tercera generación obtenida de una planta progenitora transformada con los polinucleótidos exógenos, y en donde la molécula de ARN está presente en el órgano de almacenamiento de la planta a un nivel que es al menos un 90 % del nivel en un órgano de almacenamiento de una generación anterior de la planta.

20 En un aspecto, la planta se cultiva en el campo.

Como resulta evidente, los rasgos y características preferidas de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

25 En toda la memoria descriptiva, el término "que comprende", o variaciones tales como "comprende" o "comprenden", incluye un elemento, un número o un paso mencionado, o un grupo de elementos, números o pasos, pero no excluyen cualquier otro elemento, número o paso, o grupo de elementos, números o pasos.

30 La invención se describirá de aquí en adelante por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

### Descripción breve de las figuras adjuntas

35 **Figura 1.** Vías de biosíntesis aeróbicas de DHA.

**Figura 2.** Diversas enzimas de intercambio de acilo que transfieren ácidos grasos entre PC, agrupaciones de CoA y agrupaciones de TAG. Adaptado de Singh et al. (2005).

40 **Figura 3.** Alineación múltiple entre la  $\Delta 6$ -elongasa de *Micromonas CS-0170* y genes relacionados. AAV33630, enzima de elongación de ácidos grasos C20-poliinsaturados [*Pavlova* sp. CCMP459]; AAY15135, elongasa 1 [*Pavlova salina*]; ABR67690, elongasa C20 [*Pavlova viridis*]; AAV67797, elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados [*Ostreococcus tauri*]; CAL55414, elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados (ISS) [*Ostreococcus tauri*]; XP\_001419791, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; MicCS0170-d6E,  $\Delta 6$ -elongasa de *Micromonas CS-0170* (este trabajo); AAV67800, elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thalassiosira pseudonana*]; XP\_001416454, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; ABC18313, elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thraustochytrium* sp. FJN-10]; AAV67799, elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thalassiosira pseudonana*]; AAW70157, delta-6-elongasa [*Phaeodactylum tricorutum*]; ABC18314, elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thraustochytrium* sp. FJN-10]; CAD58540, producto proteico sin nombre [*Isochrysis galbana*].

50 **Figura 4.** Alineación múltiple entre la  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas CS-0140* y genes relacionados. AAL84174, enzima de elongación 1 específica de ácidos grasos poliinsaturados [*Physcomitrella patens*]; AAT85662, elongasa de ácidos grasos poliinsaturados [*Marchantia polymorpha*]; AAV67797, elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados [*Ostreococcus tauri*]; ABO94747, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Pyrco-d6E,  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas CS-0140* (este trabajo); ABC18313, elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thraustochytrium* sp. FJN-10]; BAF97073, enzima de elongación de ácidos grasos poliinsaturados [*Mortierella alpina*]; XP\_001567488, proteína tipo enzima de elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga [*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904]; BAE71129, delta5-elongasa [*Marchantia polymorpha*]; XP\_001779105; proteína predicha [*Physcomitrella patens*].

60 **Figura 5.** Alineación múltiple entre la  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas CS-0140* y genes relacionados. AAI52204, proteína Elov14 [*Danio rerio*]; CAG01780, producto proteico sin nombre [*Tetraodon nigroviridis*]; AAV67800, elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados [*Thalassiosira pseudonana*]; AAV33630, enzima de elongación de ácidos grasos C20-poliinsaturados [*Pavlova* sp. CCMP459]; ABR67690, elongasa C20 [*Pavlova viridis*]; AAY15135, elongasa 1 [*Pavlova salina*]; AAV67798, elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados [*Ostreococcus*

65

tauri]; ABO98084, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Pyrco-d5E,  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (este trabajo).

**Figura 6.** Alineación múltiple entre la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 y genes relacionados. AAM09687, ácido graso  $\Delta 5$ -desaturasa [*Thraustochytrium* sp. ATCC21685]; AAV33631,  $\Delta 4$ -desaturasa [*Isochrysis galbana*]; AAW70159,  $\Delta 6$ -desaturasa [*Ostreococcus tauri*]; ABO99366, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; Mic-d6D,  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (este trabajo); ABF58685,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Perkinsus marinus*]; ABL96295,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Pavlova salina*].

**Figura 7.** Alineación múltiple entre la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* y genes relacionados. AAM09687, ácido graso  $\Delta 5$ -desaturasa [*Thraustochytrium* sp. ATCC21685]; AAR27297,  $\Delta 6$ -desaturasa [*Amilomyces rouxii*]; AAS93682, ácido graso  $\Delta 6$ -desaturasa [*Rhizopus oryzae*]; AAV33631,  $\Delta 4$ -desaturasa [*Isochrysis galbana*]; AAW70159,  $\Delta 6$ -desaturasa [*Ostreococcus tauri*]; Ostlu-d6D,  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* (este trabajo); ABF58685,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Perkinsus marinus*]; ABL96295,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Pavlova salina*]; EDQ92231, proteína predicha [*Monosiga brevicollis* MX1]; CAM41728, ácido graso desaturasa, putativa [*Leishmania braziliensis*]; CAM65683, ácido graso desaturasa, putativa [*Leishmania infantum*].

**Figura 8** Alineación múltiple entre la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140 y genes relacionados. AAM09687, ácido graso  $\Delta 5$ -desaturasa [*Thraustochytrium* sp. ATCC21685]; Pyrco-d5D,  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140 (este trabajo); AAT85661, ácido graso  $\Delta 6$ -desaturasa [*Marchantia polymorpha*]; AAX14505, ácido graso  $\Delta 6$ -desaturasa [*Thalassiosira pseudonana*]; ABP49078, ácido graso  $\Delta 6$ -desaturasa [*Phaeodactylum tricorutum*]; AAW70159,  $\Delta 6$ -desaturasa [*Ostreococcus tauri*]; XP\_001421073, proteína predicha [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901]; ABF58685,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Perkinsus marinus*]; CAJ07076, ácido graso desaturasa, putativa [*Leishmania major*]; ABL96295,  $\Delta 5$ -desaturasa [*Pavlova salina*]; EDQ92231, proteína predicha [*Monosiga brevicollis* MX1].

**Figura 9.** Alineación múltiple de las secuencias de la proteína  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* (Ot) (SEQ ID NO:30), de *Ostreococcus lucimarinus* (Ol) (SEQ ID NO:10) y de *Micromonas* (M) CCMP1545 (SEQ ID NO:8).

**Figura 10.** Árbol filogenético que muestra la relación entre diversas desaturasas. Pavsa-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (ABL96295); Thr21685-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium* sp. ATCC21685 (AAM09687); Mic1545-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (este trabajo); Ostta-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* (AAW70159); Ostlu-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* (este trabajo); Galga-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Gallus gallus* (XP\_421053); Homsa-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Homo sapiens* (AAG23121); Musmu-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mus musculus* (NP\_062673); Danre-d5/6D =  $\Delta 5$ -/ $\Delta 6$ -desaturasa de *Danio rerio* (AAG25710); Spaau-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Sparus aurata* putativa (AAL17639); Scoma-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Scophthalmus maximus* (AAS49163); Oncmy-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Oncorhynchus mykiss* (AAK26745); Salsa-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Salmo salar* (AAL82631); Prifa-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Primula farinosa* (AAP23034); Euggr-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Euglena gracilis*; Borof-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Borago officinalis* (AAC49700); Caeel-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Caenorhabditis elegans* (AAC15586); Rhior-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Rhizopus oryzae* (AAS93682); Moral-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (AAF08685); Moris-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella isabellina* (AAL73948); Marpo-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Marchantia polymorpha* (AAT85661); Cerpu-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ceratodon purpureus* (CAB94993); Phatr-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Phaeodactylum tricorutum* (AAL92563); Thaps-d6D =  $\Delta 6$ -desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* (AAX14505); Pavsa-d8D =  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina* (ABL96296); Phatr-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Phaeodactylum tricorutum* (AAL92562); Marpo-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Marchantia polymorpha* (AAT85663); Moral-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (AAR28035); Dicdi-d5D =  $\Delta 5$ -desaturasa de *Dictyostelium discoideum* (BAA37090).

**Figura 11.** Resultados de GC de semillas T2 de *Arabidopsis* transformadas con la construcción linP-mic1545-d6D-linT. Se muestran los niveles de SDA y GLA para los eventos individuales 1-19, indicándose la relación de las eficacias de conversión de  $\omega 3$  a  $\omega 6$  arriba de cada columna. La  $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* muestra una clara preferencia por el sustrato  $\omega 3$ .

**Figura 12.** Eficacias de conversión de las enzimas que constituyen las vías de EPA infiltradas en *N. benthamiana*. Las vías de EPA contienen una  $\Delta 6$ -desaturasa ( $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium plantagineum*,  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* o  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas pusilla*), la  $\Delta 6$ -elongasa *Pyramimonas cordata* y la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Pavlova salina*. Panel **a.** muestra las eficacias de conversión de la agrupación  $\omega 3$  para cada vía; **b.** contiene comparaciones directas entre la vía de *E. plantagineum*, la vía de *M. pusilla* y la vía que contiene estas dos desaturasas; **c.** contiene comparaciones directas entre la vía de *O. tauri*, la vía de *M. pusilla* y una vía que contiene a las dos acil-CoA desaturasas.

**Figura 13.** Confirmación por GC y GC-MS de la producción de EPA en *Nicotiana benthamiana* por una  $\omega$ 3 desaturasa de *Micromonas* RCC299 expresada de forma transitoria.

**Figura 14.** Mapa del vector binario pJP101acq que muestran las características clave del vector binario incluyendo las orientaciones del promotor, las ubicaciones de la secuencia directriz del TMV, las ubicaciones de las regiones espaciadoras y los sitios de clonación únicos para las inserciones de genes. NosT = terminador NOS, FP1 = terminador de napina truncada, LininT = terminador de Linina.

**Figura 15.** Mapa del vector binario pJP107.

**Figura 16.** Determinación de la concentración de *Agrobacterium* requerida para lograr una actividad genética casi máxima en el ensayo basado en hojas. Actividad de  $\Delta$ 9-elongasa de *Isochrysis galbana* (*Ig* $\Delta$ 9elo) en *N. benthamiana* después de infiltración con densidades de cultivo variables de AGL1 de *Agrobacterium* que contienen a la construcción de expresión binaria *Ig* $\Delta$ 9elo. El P19 co-infiltrado se definió a una concentración de DO<sub>600nm</sub> de 0,4. El eje y muestra la suma de ambas actividades *Ig* $\Delta$ 9elo para producir EDA y ETrA.

**Figura 17.** Comparación de la expresión transgénica de las vías de LC-PUFA usando una expresión transitoria o estable en hojas. Las eficacias de conversión se basan en los perfiles de ácidos grasos totales. <sup>a</sup>resultados extraídos de (Qi et al., 2004); <sup>b</sup>resultados extraídos de (Robert et al., 2005).

**Figura 18.** Adaptación metabólica en *Nicotiana benthamiana*. Panel **a**. Trazado de cromatografía gaseosa (GC) de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) producidos a partir de aceite de atún que contiene tan solo una pequeña cantidad de EPA, pero una gran cantidad de DHA. Paneles **b.** y **c.** Trazados de GC de FAME derivados de la fracción TAG de tejido foliar de *N. benthamiana* transformado transitoriamente con construcciones binarias CaMV 35S de un solo gen que contienen a la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas pusilla*, la  $\Delta$ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata*, la  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pavlova salina*, la  $\Delta$ 5-elongasa de *P. cordata* (**b.**) o la  $\Delta$ 5-elongasa de *P. salina* (**c.**) y la  $\Delta$ 4-desaturasa de *P. salina*. La acumulación de EPA en la muestra usando la  $\Delta$ 5-elongasa de *P. salina* demuestra la manera en que se pueden adaptar las vías metabólicas mediante una selección cuidadosa de un solo gen en la vía.

**Figura 19.** Mapa de la región del vector pJP3075 que comprende transgenes.

**Figura 20.** Mapa de la región del vector pJP3059 que comprende transgenes.

**Figura 21.** Mapa de la región del vector pJP3060 que comprende transgenes.

**Figura 22.** Mapa de la región del vector pJP3115 que comprende transgenes.

**Figura 23.** Mapa de la región del vector pJP3116 que comprende transgenes.

#### Clave para el listado de secuencias

SEQ ID NO:1: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 6-elongasa de *Micromonas* CS-0170.

SEQ ID NO:2:  $\Delta$ 6-elongasa de *Micromonas* CS-0170.

SEQ ID NO:3: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 6-elongasa/ $\Delta$ 9-elongasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:4:  $\Delta$ 6-elongasa/ $\Delta$ 9-elongasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:5: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 5-elongasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:6:  $\Delta$ 5-elongasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:7: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 6-desaturasa/ $\Delta$ 8-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545.

SEQ ID NO:8:  $\Delta$ 6-desaturasa/ $\Delta$ 8-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545.

SEQ ID NO:9: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:10:  $\Delta$ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:11: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* en plantas.

SEQ ID NO:12: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:13:  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140.

SEQ ID NO:14: Marco de lectura abierto parcial que codifica la  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* CS-0170.

SEQ ID NO:15:  $\omega$ 3-desaturasa parcial de *Micromonas* CS-0170.

SEQ ID NO:16: Marco de lectura abierto que codifica la  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* RCC299

SEQ ID NO:17:  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* RCC299.

SEQ ID NO:18: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* RCC299 en plantas.

SEQ ID NO:19: Marco de lectura abierto que codifica la  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545

SEQ ID NO:20:  $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545.

- SEQ ID NO:21: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana*.  
 SEQ ID NO:22:  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana*.  
 SEQ ID NO:23: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:24:  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 5 SEQ ID NO:25: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:26:  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:27: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 9$  elongasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:28:  $\Delta 9$  elongasa de *Emiliana huxleyi* CCMP1516.  
 10 SEQ ID NO:29: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 9$  elongasa de *Emiliana huxleyi* en plantas.  
 SEQ ID NO:30:  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri*.  
 SEQ ID NO:31: Dominio consenso de la elongasa 1.  
 SEQ ID NO:32: Dominio consenso de la elongasa 2.  
 SEQ ID NO:33: Dominio consenso de la elongasa 3.  
 15 SEQ ID NO:34: Dominio consenso de la elongasa 4.  
 SEQ ID NO:35: Dominio consenso de la elongasa 5.  
 SEQ ID NO:36: Dominio consenso de la elongasa 6.  
 SEQ ID NO:37: Dominio consenso de la desaturasa 1.  
 SEQ ID NO:38: Dominio consenso de la desaturasa 2.  
 20 SEQ ID NO:39: Dominio consenso de la desaturasa 3.  
 SEQ ID NO:40: Dominio consenso de la desaturasa 4.  
 SEQ ID NO: 41-71 y 78-92: Cebadores de oligonucleótidos.  
 SEQ ID NO:72: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:73:  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina*.  
 25 SEQ ID NO:74: Marco de lectura abierto que codifica la diacilglicerol aciltransferasa 1 de *Arabidopsis thaliana*.  
 SEQ ID NO:75: Diacilglicerol aciltransferasa 1 de *Arabidopsis thaliana*.  
 SEQ ID NO:76: Dominio consenso de la elongasa 7.  
 SEQ ID NO:77: Dominio consenso de la elongasa 8.  
 SEQ ID NO:93: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 9$ -elongasa de *Pavlova pinguis*.  
 30 SEQ ID NO:94:  $\Delta 9$ -elongasa de *Pavlova pinguis*.  
 SEQ ID NO:95: Marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 9$ -elongasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:96:  $\Delta 9$ -elongasa de *Pavlova salina*.  
 SEQ ID NO:97: Supresor vírico P19.  
 SEQ ID NO:98: Supresor vírico V2.  
 35 SEQ ID NO:99: Supresor vírico P38.  
 SEQ ID NO:100: Supresor vírico Pe-P0.  
 SEQ ID NO:101: Supresor vírico RPV-P0.  
 SEQ ID NO:102: Marco de lectura abierto que codifica al supresor vírico P19.  
 SEQ ID NO:103: Marco de lectura abierto que codifica al supresor vírico V2.  
 40 SEQ ID NO:104: Marco de lectura abierto que codifica al supresor vírico P38.  
 SEQ ID NO:105: Marco de lectura abierto que codifica al supresor vírico Pe-P0.  
 SEQ ID NO:106: Marco de lectura abierto que codifica al supresor vírico RPV-P0.  
 SEQ ID NO:107: Marco de lectura abierto de codones optimizados que codifica la diacilglicerol aciltransferasa 2 de *Micromonas* CCMP1545.  
 45 SEQ ID NO:108: Diacilglicerol aciltransferasa 2 de *Micromonas* CCMP1545.  
 SEQ ID NO: 109-124: Secuencias de bordes del ácido nucleico de transferencia.  
 SEQ ID NO:125: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 6$  desaturasa/ $\Delta 8$  desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 en plantas.  
 50 SEQ ID NO:126: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 6$  elongasa/ $\Delta 9$  elongasa de *Pyramimonas CS-0140* en plantas (truncado por el extremo 3' y codifica una elongasa funcional).  
 SEQ ID NO:127: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 5$  desaturasa de *Pavlova salina* en plantas.  
 SEQ ID NO:128: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 5$  elongasa de en plantas.  
 55 SEQ ID NO:129: Marco de lectura abierto de codones optimizados para la expresión de la  $\Delta 4$  desaturasa de *Pavlova salina* en plantas.

### Descripción detallada de la invención

#### 60 Técnicas generales y definiciones

A menos que específicamente se defina de otra manera, se considera que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el especialista en el arte (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, síntesis de ácidos grasos, plantas transgénicas, química de proteínas

y bioquímica).

A menos que se indique de otra manera, las técnicas de proteínas recombinantes, de cultivo celular e inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por los especialistas en el arte. Dichas técnicas se describen y explican en la literatura en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley y Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), F.M. Ausubel et al., (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow y David Lane (editores), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al., (editores), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

#### 15 Definiciones seleccionadas

Como se usa en el presente documento, el término "ácido graso" se refiere a un ácido carboxílico (o un ácido orgánico), a menudo con una cola alifática larga, ya sea saturada o insaturada. Normalmente los ácidos grasos tienen una cadena unida por enlaces carbono-carbono de al menos 8 átomos de carbono de longitud, más preferentemente de al menos 12 carbonos de longitud. La mayoría de los ácidos grasos naturales tienen un número par de átomos de carbono porque su biosíntesis comprende acetato que tiene dos átomos de carbono. Los ácidos grasos se pueden encontrar en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada tal como una parte de un triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, unido a acil-CoA (tio-éster) u otra forma unida. El ácido graso puede estar esterificado como un fosfolípido tal como en las formas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol.

Los "ácidos grasos saturados" no contienen ningún enlace doble o ningún grupo funcional a lo largo de la cadena. El término "saturado" se refiere a hidrógeno, en que todos los carbonos (además del grupo de ácido carboxílico [-COOH]) contiene tantos hidrógenos como sea posible. En otras palabras, el extremo omega ( $\omega$ ) contiene 3 hidrógenos (CH<sub>3</sub>-) y cada carbono dentro de la cadena contiene 2 hidrógenos (-CH<sub>2</sub>-).

Los "ácidos grasos insaturados" son de una forma similar a los ácidos grasos saturados, excepto que existe uno o más grupos funcionales alqueno a lo largo de la cadena, donde cada alqueno sustituye una parte "-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-" de enlace simple de la cadena con una porción "-CH=CH-" unida mediante un enlace doble (es decir, un carbono unido mediante un enlace doble a otro carbono). Los dos átomos de carbono siguientes en la cadena que están unidos por cualquiera de los lados del enlace doble pueden presentar una configuración cis o trans.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido graso monoinsaturado" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbono y solamente un grupo alqueno (enlace doble carbono-carbono) en la cadena. Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos grasos poliinsaturados" o "PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbonos y al menos dos grupos alqueno (dobles enlaces carbono-carbono).

Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga" y "LC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 20 átomos de carbono en su cadena de carbonos y al menos dos dobles enlaces carbono-carbono, y por ende incluyen a los VLC-PUFA. Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga" y "VLC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 22 átomos de carbono en su cadena de carbonos y al menos tres dobles enlaces carbono-carbono. Comúnmente, la cantidad de átomos de carbono en la cadena de carbonos de los ácidos grasos se refiere a una cadena de carbonos no ramificada. Si la cadena de carbonos es ramificada, la cantidad de átomos de carbono no incluye los correspondientes a los grupos laterales. En un aspecto, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es un ácido graso  $\omega$ 3, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. En otro aspecto, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es un ácido graso  $\omega$ 6, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el sexto enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. En un aspecto adicional, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga se seleccionan del grupo que consiste de; ácido araquidónico (ARA, 20:4 $\Delta$ 5,8,11,14;  $\omega$ 6), ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 $\Delta$ 8,11,14,17,  $\omega$ 3), ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17;  $\omega$ 3), ácido docosapentanoico (DPA, 22:5 $\Delta$ 7,10,13,16,19,  $\omega$ 3) o ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19,  $\omega$ 3). Los LC-PUFA también pueden ser ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico (DGLA) o ácido eicosatrienoico (ETrA, 20:3 $\Delta$ 11,14,17,  $\omega$ 3). Se podrá apreciar fácilmente que un LC-PUFA producido de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de cualquiera o todo lo anterior y puede incluir otros LC-PUFA o derivados de cualquiera de estos LC-PUFA. En un aspecto preferido, el ácido graso  $\omega$ 3 es EPA, DPA y/o DHA, preferentemente, EPA y/o DPA, o preferentemente DPA y/o DHA.

Además, como se usa en el presente documento, los términos "ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga" y

"ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga" se refieren al ácido graso en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada tal como formando parte de un triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, unido a acil-CoA u otra forma unida. El ácido graso puede estar esterificado como un fosfolípido tal como en las formas de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol. Por consiguiente, los LC-PUFA pueden estar presentes como una mezcla de formas en el lípido de una célula o un aceite purificado o lípido extraído de células, tejidos u organismos. En formas de realización preferidas, la invención proporciona un aceite que comprende al menos un 75 % o 85 % de triacilgliceroles, siendo el resto otras formas de lípidos tales como los ya mencionados, donde al menos dichos triacilgliceroles comprenden a los LC-PUFA. El aceite se puede purificar o tratar adicionalmente, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base fuerte para liberar el ácido graso libre, o mediante fraccionamiento, destilación o semejantes.

Las proteínas desaturasa, elongasa y acil transferasa, y los genes que codifican las mismas, que se pueden usar en la invención son cualquiera de los conocidos en el arte o bien, homólogos o derivados de los mismos. Los ejemplos de tales genes y los tamaños de las proteínas codificadas se enumeran en la Tabla 1. Las enzimas desaturasa cuya participación en la biosíntesis de los LC-PUFA ha sido demostrada, pertenecen todas al grupo de las denominadas desaturasas "front-end".

**Tabla 1.** Genes clonados relacionados con la biosíntesis de LC-PUFA

Enzima	Tipo de organismo	Especie	Nº Acceso	Tamaño de la proteína (aa)	Referencias
Δ4-desaturasa	Protista	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Algas	<i>Pavlova lutherii</i>	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		<i>Isochrysis galbana</i>	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15136	447	Zhou et al., 2007
	Traustoquitriales	<i>Thraustochytrium aureum</i>	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	N/D
		<i>Thraustochytrium sp.</i>	ATCC21685	AAM09688	519
Δ5-desaturasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Nematodos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts y Browse, 1999b
	Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		<i>Dictyostelium discoideum</i>	AB022097	467	Saito et al., 2000
		<i>Saprolegnia diclina</i>		470	WO02081668
	Diatomeas	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	AY082392	469	Domergue et al., 2002
	Algas	<i>Thraustochytrium sp.</i>	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	WO02081668
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	WO02081668
	Musgo	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
Δ6-desaturasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Nematodos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998
	Plantas	<i>Borago officinales</i>	U79010	448	Sayanova et al., 1997
<i>Echium</i>		AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002	

Enzima	Tipo de organismo	Especie	Nº Acceso	Tamaño de la proteína (aa)	Referencias
		<i>Primula vialii</i>	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		<i>Anemone leveillei</i>	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Musgos	<i>Ceratodon purpureus</i>	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		<i>Physcomitrella patens</i>	CAA11033	525	Girke et al., 1998
	Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		<i>Mucor circinelloides</i>	AB052086	467	NCBI*
		<i>Rhizopus sp.</i>	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		<i>Saprolegnia diclina</i>		453	WO02081668
	Diatomeas	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Bacteria	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Algas	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	WO02081668
Δ5/Δ6 desaturasa bifuncional	Peces	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 Δ8-desaturasa	Algas	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis y Browse, 1999
	Plantas	<i>Borago officinales</i>	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
Δ6-elongasa	Nematodos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Musgos	<i>Physcomitrella patens</i>	AF428243	290	Zank et al., 2002
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Algas	<i>Pavlova lutheri</i> **		501	WO 03078639
		<i>Thraustochytrium</i>	AX951565	271	WO 03093482
		<i>Thraustochytrium sp</i> **	AX214454	271	WO 0159128
PUFA-elongasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i>	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i> **	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		<i>Mus musculus</i>	AF170907	279	Tvrđik et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	AF170908	292	Tvrđik et al., 2000
	Peces	<i>Danio rerio</i>	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		<i>Danio rerio</i> **	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Gusanos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z68749	309	Abbott et al 1998 Beaudoin et al 2000
	Algas	<i>Thraustochytrium aureum</i> **	AX464802	272	WO 0208401-A2
		<i>Pavlova lutheri</i> **		320	WO 03078639
Δ9-elongasa	Algas	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
Δ5-elongasa	Algas	<i>Ostreococcus tauri</i>	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		<i>Pyramimonas cordata</i>		268	este trabajo
		<i>Pavlova sp. CCMP459</i>	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAY15135	302	Robert et al., 2009

Enzima	Tipo de organismo	Especie	Nº Acceso	Tamaño de la proteína (aa)	Referencias
	Diatomeas	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Peces	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAM55862	295	WO 06/008099
	Musgo	<i>Marchantia polymorpha</i>	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006
* <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ** Función no comprobada/no demostrada					

Como se usa en el presente documento, el término "desaturasa *front-end*" se refiere a un miembro de una clase de enzimas que introduce un enlace doble entre el grupo carboxilo y una parte insaturada pre-existente de la cadena de acilo de lípidos, que se caracteriza estructuralmente por la presencia de un dominio citocromo b5 N-terminal, junto con un típico dominio de la ácido graso desaturasa que incluye tres cajas de histidina altamente conservadas (Napier et al., 1997).

Se puede evaluar la actividad de cualquiera de las elongasas o desaturasas para su uso en la invención mediante expresión de un gen que codifica la enzima en una célula tal como, por ejemplo, una célula de levadura o una célula vegetal, y determinar si la célula tiene una mayor capacidad para producir LC-PUFA en comparación con una célula comparable en la cual no se expresa la enzima.

En una realización, la desaturasa y/o elongasa para su uso en la invención se puede purificar a partir de un alga microscópica.

Aunque determinadas enzimas se describen específicamente en la presente como "bifuncionales", la ausencia de dicho término no implica necesariamente que una enzima particular no tenga una actividad distinta de la definida específicamente.

#### Desaturasas

Como se usa en el presente documento, el término "desaturasa" se refiere a una enzima que tiene la capacidad de introducir un enlace doble carbono-carbono en el grupo acilo de un sustrato de ácido graso que normalmente se encuentra en una forma esterificada tal como, por ejemplo, CoA ésteres de ácidos grasos. El grupo acilo puede estar esterificado a un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), o a una proteína transportadora de acilo (ACP) o, en un aspecto preferido, a CoA. Las desaturasas generalmente se pueden clasificar en tres grupos en consecuencia. En un aspecto, la desaturasa es una desaturasa *front-end*.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 4$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 4 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. La " $\Delta 4$  desaturasa" puede convertir al menos DPA en DHA. El paso de desaturación para producir DHA a partir de DPA es catalizado por una  $\Delta 4$  desaturasa en organismos distintos de mamíferos, y se ha aislado un gen que codifica esta enzima de la especie protista de agua dulce *Euglena gracilis* y de especies marinas del género *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). En un aspecto, la  $\Delta 4$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:73, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:73.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 5$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 5 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Los ejemplos de  $\Delta 5$  desaturasas se enumeran en la Tabla 1. En un aspecto, la  $\Delta 5$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:26, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO:26. En otro aspecto, la  $\Delta 5$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 53 % idéntica a la SEQ ID NO:13.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 6$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 6 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Los ejemplos de  $\Delta 6$  desaturasas se enumeran en la Tabla 1.

En una realización, la  $\Delta 6$  desaturasa se caracteriza además por presentar al menos dos, preferentemente las tres, y preferentemente en una célula vegetal, de lo siguiente: i) mayor actividad  $\Delta 6$  desaturasa sobre ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3 $\Delta$ 9,12,15,  $\omega$ 3) que sobre ácido linoleico (LA, 18:2 $\Delta$ 9,12,  $\omega$ 6) como sustrato de ácido graso; ii) mayor actividad  $\Delta 6$  desaturasa sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso; y iii) actividad  $\Delta 8$  desaturasa sobre ETrA.

En otra realización, la  $\Delta 6$  desaturasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 3$  que el correspondiente sustrato  $\omega 6$  y tiene actividad sobre ALA para producir ácido octadecatetraenoico (ácido estearidónico, SDA, 18:4 $\Delta 6,9,12, 15, \omega 3$ ) con una eficacia de al menos 5 %, más preferentemente de al menos 7,5 % o con mayor preferencia de al menos 10 % cuando se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula recombinante, o al menos un 35 % cuando se expresa en una célula de levadura. En un aspecto, la  $\Delta 6$  desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces más actividad  $\Delta 6$  desaturasa, sobre ALA que sobre LA como sustrato de ácido graso. En otro aspecto, la  $\Delta 6$  desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces más actividad  $\Delta 6$  desaturasa o al menos 10 veces más actividad, sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido en la posición sn-2 de PC como sustrato de ácido graso.

En una realización, la  $\Delta 6$  desaturasa no presenta una actividad  $\Delta 5$  desaturasa detectable sobre ETA. En otra realización, la  $\Delta 6$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:10, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 77 % idéntica a la SEQ ID NO:10. En otra realización, la  $\Delta 6$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:8, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 67 % idéntica a la SEQ ID NO:8. La  $\Delta 6$  desaturasa también puede presentar actividad  $\Delta 8$  desaturasa.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 8$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 8 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. La  $\Delta 8$  desaturasa puede convertir al menos ETrA en ETA. Los ejemplos de  $\Delta 8$  desaturasas se enumeran en la Tabla 1. En un aspecto, la  $\Delta 8$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:24, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO:24.

Como se usa en el presente documento, una " $\omega 3$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 3 desde el extremo metilo de un sustrato de ácido graso. Los ejemplos de  $\omega 3$  desaturasas incluyen los que fueron descritos por Pereira et al., (2004a), Horiguchi et al., (1998), Berberich et al., (1998) y Spychalla et al. (1997).

En una realización, la  $\omega 3$  desaturasa puede convertir al menos uno entre ARA en EPA, DGLA en ETA, ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA, 18:3 $\Delta 6,9,12, \omega 6$ ) en SDA, ambos ARA en EPA y DGLA en ETA, ambos ARA en EPA y GLA en SDA, o las tres opciones.

En una realización, la  $\omega 3$  desaturasa tiene actividad  $\Delta 17$  desaturasa sobre un C20 ácido graso que tiene al menos tres dobles enlaces carbono-carbono, preferentemente ARA. En otra realización, la  $\omega 3$  desaturasa tiene actividad  $\Delta 15$  desaturasa sobre un C18 ácido graso que tiene tres dobles enlaces carbono-carbono, preferentemente GLA.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 15$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 15 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 17$  desaturasa" se refiere a una proteína que interviene en una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en la posición 17 desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso.

En otra realización, la  $\omega 3$  desaturasa tiene mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA, por ejemplo, ARA-CoA, que sobre el correspondiente sustrato de acil-PC. Como se usa en el presente documento, un "correspondiente sustrato de acil-PC" se refiere al ácido graso esterificado en la posición sn-2 de fosfatidilcolina (PC), donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato de acil-CoA. En un aspecto, la actividad es al menos dos veces mayor.

En una realización adicional, la  $\omega 3$  desaturasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:15, 17 o 20, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 35 % idéntica a la SEQ ID NO:15, al menos un 60 % idéntica a la SEQ ID NO:17 y/o al menos un 60 % idéntica a la SEQ ID NO:20.

En otro aspecto más adicional, una desaturasa para uso en la presente invención tiene mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que sobre el correspondiente sustrato de acil-PC. Según se indicó previamente, un "correspondiente sustrato de acil-PC" se refiere al ácido graso esterificado en la posición sn-2 de fosfatidilcolina (PC), donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato de acil-CoA. En un aspecto, la actividad es al menos dos veces mayor. En un aspecto, la desaturasa es una  $\Delta 5$  o  $\Delta 6$  desaturasa, de los cuales se ofrecen ejemplos, pero en un sentido no limitativo, entre los enumerados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Desaturasas con mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que sobre un correspondiente sustrato de acil-PC

Enzima	Tipo de organismo	Especie	Nº Acceso	Tamaño de la proteína (aa)	Referencias
$\Delta 6$ -desaturasa	Algas	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann <i>et al.</i> 2008
		<i>Ostreococcus tauri</i>	AAW70159	456	Domergue <i>et al.</i> 2005
$\Delta 5$ -desaturasa	Algas	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann <i>et al.</i> 2008
	Plantas	<i>Anemone leveillei</i>	N/D		Sayanova <i>et al.</i> 2007

5 *Elongasas*

La evidencia bioquímica sugiere que la elongación de ácidos grasos consiste de 4 pasos: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. En el contexto de esta invención, una "elongasa" se refiere al polipéptido que cataliza el paso de condensación en la presencia de los otros miembros del complejo de elongación, bajo condiciones fisiológicas adecuadas. Se ha demostrado que solamente se requiere de la expresión heteróloga u homóloga en una célula del componente de condensación ("elongasa") del complejo de elongación proteico para lograr la elongación de la respectiva cadena de acilo. Por consiguiente, la elongasa introducida puede reclutar exitosamente las actividades de reducción y deshidratación del huésped transgénico para realizar exitosamente elongaciones de acilos. Se cree que la especificidad de la reacción de elongación con respecto a la longitud de la cadena y el grado de desaturación del sustrato de ácido grasos reside en el componente de condensación. Se cree asimismo que es limitante de la velocidad en la reacción de elongación.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 5$  elongasa" puede convertir al menos EPA en DPA. Los ejemplos de  $\Delta 5$  elongasas incluyen los que se divulgan en WO2005/103253. En un aspecto, la  $\Delta 5$  elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos 60 %, más preferentemente de al menos 65 %, más preferentemente de al menos 70 % o con mayor preferencia de al menos 75 %. En un aspecto adicional, la  $\Delta 5$  elongasa comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:6, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 6$  elongasa" puede convertir al menos SDA en ETA. Los ejemplos de  $\Delta 6$  elongasas incluyen los que se enumeran en la Tabla 1. En un aspecto, la elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:4, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 55 % idéntica a la SEQ ID NO:4.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 9$  elongasa" puede convertir al menos ALA en ETrA. Los ejemplos de  $\Delta 9$  elongasas incluyen los que se enumeran en la Tabla 1. En un aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:22, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO:22. En otro aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:28, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 81 % idéntica a la SEQ ID NO:28. En otro aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:94, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94. En otro aspecto, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:96, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:96. En un aspecto adicional, la  $\Delta 9$  elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:94 o en la SEQ ID NO:96, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO:94 y/o en la SEQ ID NO:96, y en donde la elongasa tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 6$  que sobre el correspondiente sustrato  $\omega 3$ .

Como se usa en el presente documento, el término "tiene mayor actividad sobre un sustrato  $\omega 6$  que sobre el correspondiente sustrato  $\omega 3$ " se refiere a la actividad relativa de la enzima sobre sustratos que difieren por la acción de una  $\omega 3$  desaturasa. Preferentemente, el sustrato  $\omega 6$  es LA y el sustrato  $\omega 3$  es ALA.

Como se usa en el presente documento, una "elongasa con actividad  $\Delta 6$  elongasa y  $\Delta 9$  elongasa" puede por lo menos (i) convertir SDA en ETA y (ii) convertir ALA en ETrA y tiene mayor actividad  $\Delta 6$  elongasa que actividad  $\Delta 9$  elongasa. En un aspecto, la elongasa tiene una eficacia de conversión sobre SDA para producir ETA que es de al menos un 50 %, más preferentemente de al menos un 60 %, y/o una eficacia de conversión sobre ALA para producir ETrA que es de al menos un 6 % o más preferentemente de al menos un 9 %. En otro aspecto, la elongasa tiene al menos 6,5 veces más actividad  $\Delta 6$  elongasa aproximadamente que actividad  $\Delta 9$  elongasa. En un aspecto adicional, la elongasa no tiene una actividad  $\Delta 5$  elongasa detectable. En otro aspecto más, la elongasa comprende aminoácidos cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO:4, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la SEQ ID NO:4.

#### Otras enzimas

Como se usa en el presente documento, el término "diacilglicerol aciltransferasa" (EC 2,3,1.20; DGAT) se refiere a una proteína que transfiere un grupo acilo graso desde el acil-CoA hasta un sustrato de diacilglicerol para producir un triacilglicerol. Por consiguiente, el término "actividad diacilglicerol aciltransferasa" se refiere a la transferencia de acil-CoA al diacilglicerol para producir triacilglicerol. Hay tres tipos conocidos de DGAT denominados DGAT1, DGAT2 y DGAT3 respectivamente. Los polipéptidos DGAT1 tienen normalmente 10 dominios transmembrana, DGAT2 tienen normalmente 2 dominios transmembrana, en tanto DGAT3 normalmente es soluble. Los ejemplos de polipéptidos DGAT1 incluyen polipéptidos codificados por los genes DGAT1 de *Aspergillus fumigatus* (N° Acceso XP\_755172), de *Arabidopsis thaliana* (CAB44774), de *Ricinus communis* (AAR11479), de *Vernicia fordii* (ABC94472), de *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), de *Euonymus alatus* (AAV31083), de *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), de *Rattus norvegicus* (NP\_445889), de *Homo sapiens* (NP\_036211), así como variantes y/o mutantes de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos DGAT2 incluyen polipéptidos codificados por los genes DGAT2 de *Arabidopsis thaliana* (N° Acceso NP\_566952), de *Ricinus communis* (AAY16324), de *Vernicia fordii* (ABC94474), de *Mortierella ramanniana* (AAK84179), de *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), de *Mus musculus* (AAK84175), de *Micromonas* CCMP1545, así como variantes y/o mutantes de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos DGAT3 incluyen polipéptidos codificados por los genes DGAT3 de maní (*Arachis hypogaea*, Saha, et al., 2006), así como variantes y/o mutantes de los mismos.

#### Polipéptidos/Péptidos

La memoria descriptiva también proporciona polipéptidos que pueden ser purificados o recombinantes. Un "polipéptido sustancialmente purificado" o un "polipéptido purificado" se refieren, según los autores, a un polipéptido que ha sido separado en general de los lípidos, ácidos nucleicos, otros péptidos y otras moléculas contaminantes con los cuales está asociado en la célula donde fue producido o en su estado nativo. Preferentemente, el polipéptido sustancialmente purificado está al menos un 60 % libre, más preferentemente al menos un 75 % libre y más preferentemente al menos un 90 % libre de otros componentes en la célula donde fue producido o con los cuales está asociado naturalmente.

El término "recombinante" en el contexto de un polipéptido se refiere al polipéptido cuando es producido por una célula, o en un sistema de expresión no celular, en una cantidad alterada o a una velocidad alterada, en comparación con su estado nativo si se produce naturalmente. En un aspecto, la célula es una célula que no produce naturalmente al polipéptido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un gen no endógeno que causa la producción de una cantidad alterada del polipéptido. Un polipéptido recombinante de la invención incluye polipéptidos en la célula, tejido, órgano u organismo, o en un sistema de expresión no celular, en donde es producido, es decir, un polipéptido que no tiene que ser purificado o separado de otros componentes de la célula transgénica (recombinante) en la cual se produjo, y polipéptidos producido en dichas células o sistemas no celulares que luego son purificado de por los menos algunos de los demás componentes.

Los términos "polipéptido" y "proteína" generalmente se usan indistintamente.

Un polipéptido o clase de polipéptidos se puede definir por el grado de identidad (% de identidad) de su secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia, o por tener un mayor % de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia que con otra. El % de identidad de un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de referencia se determina normalmente mediante el análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970; programa GCG) con los parámetros de una penalidad por creación de hueco = 5 y una penalidad por extensión de hueco = 0,3. La secuencia de consulta es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 50 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 100 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Aún más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 250 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Más preferentemente aún, el análisis GAP alinea dos secuencias sobre su longitud completa. El polipéptido o la clase de polipéptidos pueden tener la misma actividad enzimática o una actividad diferente o una falta de actividad, con respecto al polipéptido de referencia. Preferentemente, el polipéptido tiene una actividad enzimática de al menos 10 % de la actividad del polipéptido de referencia.

Como se usa en el presente documento, un fragmento "biológicamente activo" es una porción de un polipéptido de la invención que mantiene una actividad definida de un polipéptido de referencia de longitud completa, por ejemplo, puede tener actividad desaturasa y/o elongasa u otra actividad enzimática. Los fragmentos biológicamente activos, Como se usa en el presente documento, excluyen al polipéptido de longitud completa. Los fragmentos biológicamente activos pueden ser una porción de cualquier tamaño, siempre que conserven la actividad definida. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo conserva al menos un 10 % de la actividad de la proteína de longitud completa.

Con respecto a un polipéptido o a una enzima definida, se podrá apreciar que las cifras de % de identidad mayores que las provistas en la presente abarcarán formas de realización preferidas. Por consiguiente, cuando fuera aplicable, a la luz de las cifras mínimas de % de identidad, se prefiere que el polipéptido/enzima comprenda una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, más preferentemente al menos 65 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 76 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 91 %, más preferentemente al menos 92 %, más preferentemente al menos 93 %, más preferentemente al menos 94 %, más preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, más preferentemente al menos 97 %, más preferentemente al menos 98 %, más preferentemente al menos 99 %, más preferentemente al menos 99,1 %, más preferentemente al menos 99,2 %, más preferentemente al menos 99,3 %, más preferentemente al menos 99,4 %, más preferentemente al menos 99,5 %, más preferentemente al menos 99,6 %, más preferentemente al menos 99,7 %, más preferentemente al menos 99,8 % y aún más preferentemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID N° relevante nominado.

En una realización, la  $\Delta 6$  desaturasa purificada y/o recombinante de la presente invención no comprende una secuencia proporcionada en el n.º de acceso EEH58637.1 o XP\_001421073.1. En otra realización, la  $\omega 3$  desaturasa purificada y/o recombinante de la invención no comprende una secuencia proporcionada en el n.º de acceso XP\_002505536.1. En otra realización, el DGAT de la invención no comprende una secuencia proporcionada en el n.º de acceso EEH54819.1.

Los mutantes de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos definidos en el presente documento se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico definido en la presente, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, supresiones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Se puede emplear una combinación de supresión, inserción y sustitución para obtener la construcción final, siempre que el producto peptídico final posea las características deseadas.

Los péptidos mutantes (alterados) se pueden preparar usando cualquier técnica conocida en el arte. Por ejemplo, se puede someter a un polinucleótido de la invención a mutagénesis *in vitro*. Dichas técnicas de mutagénesis *in vitro* incluyen subclonación del polinucleótido en un vector adecuado, transformación del vector en una cepa "de mutación" tal como la cepa XL-1 red de *E. coli* (Stratagene) y propagación de la bacteria transformada por una cantidad adecuada de generaciones. En otro ejemplo, los polinucleótidos de la invención son sometidos a técnicas de entremezclado de ADN como se describe en general en Harayama (1998). Los productos derivados del ADN mutado/alterado pueden ser examinados fácilmente usando las técnicas que se describen en la presente para determinar si poseen actividad desaturasa y/o elongasa.

Cuando se diseñan secuencias de aminoácidos mutantes, la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerá de la o las características a modificar. Los sitios para la mutación se pueden modificar individualmente o en serie, por ejemplo, por (1) sustitución primero con las elecciones de los aminoácidos conservadores y luego con selecciones más radicales dependiendo de los resultados obtenidos, (2) suprimir el residuo de interés o (3) insertar otros residuos adyacentes al sitio ubicado.

Las supresiones de secuencia de aminoácidos varían en general en un rango entre 1 y 15 residuos aproximadamente, más preferentemente entre 1 y 10 residuos aproximadamente y normalmente entre 1 y 5 residuos contiguos aproximadamente.

En estos mutantes de sustitución se ha eliminado al menos un residuo de aminoácido en la molécula del polipéptido y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen los sitios identificados como sitio(s) activo(s). Otros sitios de interés son aquellos en los cuales los residuos particulares obtenidos de diversas cepas o especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, en especial los que se encuentran dentro de una secuencia de al menos tres sitios idénticamente conservados adicionales, se sustituyen preferentemente de una manera relativamente conservadora. Tales sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 en la columna con el encabezado de "Ejemplos de sustituciones".

En una realización preferida, un polipéptido mutante/variante tiene solamente, o no más de, uno o dos o tres o cuatro cambios de aminoácidos conservadores en comparación con un polipéptido natural. Los detalles de los cambios de aminoácidos conservadores se indican en la Tabla 3. Como comprenderá el especialista, tales cambios

menores pueden ser razonablemente predichos para no alterar la actividad del polipéptido cuando se expresa en una célula recombinante.

**Tabla 3.** Ejemplos de sustituciones.

Resto original	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

5

También se incluyen en el alcance de la invención los polipéptidos definidos en el presente documento que fueron modificados diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, clivaje proteolítico, unión a una molécula de anticuerpo o a otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para incrementar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.

10

Los polipéptidos se pueden producir de diversas maneras, incluyendo producción y recuperación de polipéptidos naturales, producción y recuperación de polipéptidos recombinantes y síntesis química de los polipéptidos. En un aspecto, el polipéptido recombinante se puede producir mediante cultivo de una célula capaz de expresar el polipéptido bajo condiciones eficaces para producir el polipéptido. A continuación, el polipéptido recombinante puede ser secretado de la célula y recuperado, o se lo puede extraer de la célula y recuperarlo luego, y preferentemente se lo purifica separándolo de las moléculas contaminantes. Se puede modificar, además, químicamente o enzimáticamente. Una célula preferida para cultivar es una célula recombinante definida en la presente. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero en un sentido no limitativo, condiciones eficaces de medios, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan producir polipéptidos. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir un polipéptido definido en la presente. Dicho medio comprende normalmente un medio acuoso que contiene fuentes de carbono asimilable, nitrógeno y fósforo, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células definidas en la presente se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, frascos con agitación, tubos de ensayo, placas para microtitulación y cajas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a los valores de temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo son propias del conocimiento del especialista en el arte. La célula más preferida para producir el polipéptido es una célula de una planta, en especial de la semilla de una planta.

15

20

25

30

Para los fines de la presente invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión para un analito de interés, así como compuestos que comprenden a dichos fragmentos. Dichos fragmentos incluyen los fragmentos F<sub>v</sub>, F(ab')<sub>2</sub> y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos de cadena simple (scFv). Los anticuerpos de la invención pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden producir usando procedimientos estándar en el arte.

35

#### Polinucleótidos

La memoria descriptiva también provee polinucleótidos que pueden ser, por ejemplo, un gen, un polinucleótido aislado o un ADN quimérico. Puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético, de cadena doble o de cadena simple, y combinados con carbohidratos, lípidos, proteínas u otros materiales para realizar una actividad particular definida en la presente. El término "polinucleótido" se usa indistintamente en la presente con el término "molécula de ácido nucleico". Un "aislado polinucleótido" significa, según los autores, un polinucleótido que, si se obtiene de una fuente natural, ha sido separado de las secuencias de polinucleótidos con las cuales está asociado o unido en su

40

estado nativo, o un polinucleótido no natural. Preferentemente, el polinucleótido aislado está al menos un 60 % libre, más preferentemente al menos un 75 % libre y más preferentemente al menos un 90 % libre de los otros componentes con los cuales está naturalmente asociado.

5 Como se usa en el presente documento, el término "gen" se interpreta en su sentido más amplio e incluye las secuencias de desoxirribonucleótidos que comprenden a la región transcrita y, si se traducen, la región codificante de la proteína, de un gen estructural e inclusive las secuencias ubicadas adyacentes a la región codificante por ambos extremos 5' y 3' para una distancia de al menos 2 kb aproximadamente por cualquier extremo y que están relacionadas con la expresión del gen. En este sentido, el gen incluye las señales de control, tales como promotores, 10 potenciadores, señales de terminación y/o de poliadenilación, que están asociadas naturalmente con un gen dado, o señales de control heterólogas en cuyo caso el gen se conoce como un "gen quimérico". Las secuencias ubicadas 5' con respecto a la región codificante de la proteína y que están presentes sobre el ARNm se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias ubicadas 3' con respecto a la región codificante de la proteína y que están presentes sobre el ARNm se denominan secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca tanto al ADNc como 15 las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante que puede interrumpirse con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intervinientes" o "secuencias intervinientes". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en un ARN nuclear (ARNhn). Los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones son removidos o "procesados fuera" del transcripto nuclear o primario; por ello no hay intrones en el transcripto de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción especificando la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente. El término "gen" incluye una molécula sintética o de fusión que codifica todo o parte de las proteínas de la invención que se describen en la presente y una secuencia de nucleótidos complementaria de cualquiera de las mencionadas anteriormente.

25 Como se usa en el presente documento, un "ADN quimérico" se refiere a cualquier molécula de ADN que no es una molécula de ADN nativa en su ubicación nativa, también denominada "construcción de ADN" en la presente. Normalmente, un ADN quimérico, o un gen quimérico, comprende secuencias reguladoras y transcritas o codificantes de proteínas que no se hallan juntos en la naturaleza. Por consiguiente, un ADN quimérico o un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de fuentes diferentes, o 30 secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de la misma fuente, pero dispuestas de una manera distinta de la disposición en la cual se encuentran en la naturaleza.

El término "endógeno" se usa en la presente para hacer referencia a una sustancia que normalmente está presente o es producida en una planta no modificada en la misma etapa del desarrollo que la planta bajo investigación. Un 35 "gen endógeno" hace referencia a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. Como se usa en el presente documento, una "molécula de ácido nucleico recombinante", un "polinucleótido recombinante" o variaciones de los mismos, se refieren a una molécula de ácido nucleico que fue construido o modificado mediante tecnología de ADN recombinante. Los términos "polinucleótido extraño" o "polinucleótido exógeno" o "polinucleótido heterólogo" y semejantes, se refieren a cualquier ácido nucleico que se introduce en el genoma de una célula mediante manipulaciones experimentales. Los genes extraños o exógenos pueden ser genes que se insertan en un organismo no nativo, genes nativos introducidos en una nueva ubicación dentro del huésped nativo o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que fue introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. Los términos "modificado genéticamente", "transgénico" y variaciones de los mismos incluyen la introducción de genes en células por transformación o transducción, mutación de genes en células y alteración o 45 modulación de la regulación de un gen en una célula o en organismos en los cuales se han realizado estas prácticas o en su progenie. Una "región genómica", Como se usa en el presente documento, se refiere a una posición dentro del genoma en donde se ha insertado un transgén, o un grupo de transgenes (también denominado agrupación en la presente), en una célula, o en un ancestro de la misma. Dichas regiones comprenden solamente nucleótidos que fueron incorporados por la intervención del hombre, tal como mediante los métodos que se describen en la presente.

50 El término "exógeno", en el contexto de un polinucleótido, se refiere al polinucleótido cuando está presente en una célula en una cantidad alterada en comparación con su estado nativo. En un aspecto, la célula es una célula que no comprende naturalmente al polinucleótido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que da como resultado una cantidad alterada de producción del polipéptido codificado. Un polinucleótido exógeno de la invención incluye polinucleótidos que no han sido separados de los demás componentes de la célula transgénica (recombinante), o de un sistema de expresión no celular, en el cual está presente, y los polinucleótidos producidos en tales células o en sistemas no celulares que luego se separan por purificación de por lo menos algunos de los demás componentes. El polinucleótido exógeno (ácido nucleico) puede ser una extensión contigua de nucleótidos existente en la naturaleza, o comprende dos o más extensiones contiguas de nucleótidos de fuentes diferentes (naturales y/o sintéticas) unidas para formar un solo polinucleótido. Normalmente dichos polinucleótidos quiméricos comprenden al menos un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención ligado operativamente a un promotor adecuado para dirigir la transcripción del marco de lectura abierto en una célula de interés.

65 Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótidos exógenos diferentes", o variaciones del mismo, significa que la secuencia de nucleótidos de cada polinucleótido es diferente en al menos uno, preferentemente más,

nucleótidos. Los polinucleótidos codifican ARN que se puede traducir, o no, en una proteína dentro de la célula. En un ejemplo, se prefiere que cada polinucleótido codifique una proteína con una actividad diferente. En otro ejemplo, cada polinucleótido exógeno es menos que un 95 %, menos que un 90 % o menos que un 80 % idéntica a los otros polinucleótidos exógenos. Preferentemente, los polinucleótidos exógenos codifican proteínas/enzimas funcionales. Además, se prefiere que no se superpongan los polinucleótidos exógenos diferentes, que cada polinucleótido se encuentre en una región distinta como, por ejemplo, el ácido nucleico de transferencia extracromosómico que no se superpone con otro polinucleótido exógeno. Como mínimo, cada polinucleótido exógeno tiene un sitio de inicio y terminación de la transcripción, así como el promotor designado. Un polinucleótido exógeno individual puede comprender intrones, o no.

Con respecto a los polipéptidos definidos, se podrá apreciar que las cifras de % de identidad mayores que las provistas antes abarcarán formas de realización preferidas. Por consiguiente, cuando fuera aplicable, a la luz de las cifras mínimas de % de identidad, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia de polinucleótidos que es al menos 60 %, más preferentemente al menos 65 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 91 %, más preferentemente al menos 92 %, más preferentemente al menos 93 %, más preferentemente al menos 94 %, más preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, más preferentemente al menos 97 %, más preferentemente al menos 98 %, más preferentemente al menos 99 %, más preferentemente al menos 99,1 %, más preferentemente al menos 99,2 %, más preferentemente al menos 99,3 %, más preferentemente al menos 99,4 %, más preferentemente al menos 99,5 %, más preferentemente al menos 99,6 %, más preferentemente al menos 99,7 %, más preferentemente al menos 99,8 % y aún más preferentemente al menos 99,9 % idéntica al SEQ ID N° relevante nominado.

En una realización, el polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica una  $\Delta 6$  desaturasa de la invención no comprende la secuencia del genoma de *Micromonas* u *Ostreococcus* que predice la codificación de la secuencia de aminoácidos, proporcionada en el número de acceso EEH58637.1 o XP\_001421073.1 respectivamente. En otra realización, el polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica una  $\omega 3$  desaturasa de la invención no comprende la secuencia del genoma de *Micromonas* que predice la codificación de la secuencia de aminoácidos proporcionada en el número de acceso XP\_002505536.1. En otra realización, el polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica una DGAT de la invención no comprende la secuencia del genoma de *Micromonas* que predice la codificación de la secuencia de aminoácidos proporcionada en el número de acceso en EEH54819.1.

Un polinucleótido de la presente invención se puede hibridar selectivamente, bajo condiciones severas, con un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Como se usa en el presente documento, las condiciones severas son aquellas que (1) durante la hibridación emplean un agente desnaturante tal como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 % (p/v), Ficoll 0,1 %, polivinilpirrolidona 0,1 %, solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (2) emplean formamida 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 g/ml), SDS 0,1 % y sulfato de dextrano 10 % a 42°C en SSC 0,2 x y SDS 0,1 % y/o (3) emplean una fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/SDS 0,1 % a 50°C.

Los polinucleótidos de la invención pueden contener, en comparación con las moléculas naturales, una o más mutaciones que son supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los polinucleótidos que contienen mutaciones con relación a una secuencia de referencia pueden ser naturales (vale decir, aislados de una fuente natural) o sintéticas (por ejemplo, obtenidos mediante mutagénesis dirigida al sitio o entremezclado de ADN del ácido nucleico descrito precedentemente). Por consiguiente, resulta evidente que los polinucleótidos de la invención pueden provenir de una fuente natural o recombinante.

#### Vectores recombinantes

Un aspecto de la presente invención incluye un vector recombinante, que comprende al menos una molécula de polinucleótidos definida en la presente, insertada en cualquier vector capaz de distribuir la molécula de polinucleótidos en una célula hospedadora. Los vectores recombinantes incluyen vectores de expresión. Los vectores recombinantes contienen secuencias de polinucleótidos heterólogas, es decir, secuencias de polinucleótidos que no se encuentran naturalmente adyacentes a las moléculas de polinucleótidos definidas en la presente que preferentemente derivan de una especie distinta de la especie de la cual derivan las moléculas de polinucleótidos. El vector puede ser de ARN o ADN, ya sea procarionta o eucariota, y normalmente es un vector vírico, derivado de un virus, o un plásmido. Los vectores de plásmidos incluyen normalmente secuencias de ácidos nucleicos adicionales que proporcionan una manera fácil de selección, amplificación y transformación del casete de expresión en células procariontas, por ejemplo, vectores derivados de pUC, vectores derivados de pSK, vectores derivados de pGEM, vectores derivados de pSP, vectores derivados de pBS o vectores binarios que contienen una o más regiones de ADN-T. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales incluyen orígenes de replicación para proporciona una replicación autónoma del vector, genes marcadores seleccionables, que preferentemente codifican resistencia a antibióticos o herbicidas, múltiple sitios de clonación únicos que proporcionan múltiples sitios para

insertar secuencias de ácidos nucleicos o genes codificados en la construcción de ácido nucleico, y secuencias que mejoran la transformación de células procariotas y eucariotas (en especial plantas). El vector recombinante puede comprender más de un polinucleótido definido en la presente, por ejemplo tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos de la invención combinados, cada uno ligado operativamente a secuencias de control de la expresión que sean operables en la célula de interés. Dicho más de un polinucleótido de la invención, por ejemplo 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos, preferentemente están unidos de forma covalente en un solo vector recombinante, que luego se puede introducir como una sola molécula en una célula para formar una célula recombinante de acuerdo con la invención y preferentemente integrarse en el genoma de la célula recombinante, por ejemplo en una planta transgénica. De esta manera, los polinucleótidos así unidos serán heredados juntos como un solo locus genético en la progenie de la célula o planta recombinante. El vector o la planta recombinante puede comprender dos o más de tales vectores recombinantes, cada uno de los cuales contiene múltiples polinucleótidos, por ejemplo en donde cada vector recombinante comprende 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos.

El término "ligado operativamente", Como se usa en el presente documento, se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional de un elemento regulador de la transcripción (promotor) con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una secuencia codificante, tal como un polinucleótido definido en la presente, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada. En general, los elementos promotores reguladores de la transcripción que están ligados operativamente a una secuencia transcrita se encuentran físicamente contiguos de la secuencia transcrita, es decir, actúan en *cis*. Sin embargo, algunos de los elementos reguladores de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan ubicarse físicamente contiguas o en muy próximas de las secuencias codificantes cuya transcripción mejoran.

Cuando se encuentran presentes múltiples promotores, cada promotor puede ser igual o diferente.

Las moléculas recombinantes, tales como los ADN quiméricos también pueden contener (a) una o más señales secretoras que codifican secuencias de péptidos señal, para permitir la secreción de un polipéptido expresado definido en la presente de la célula que produce dicho polipéptido o que proporcione la localización del polipéptido expresado, por ejemplo para retener el polipéptido en el retículo endoplásmico (ER) de la célula o transferirlo a un plástido, y/o (b) secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácidos nucleicos como proteínas de fusión. Los ejemplos de segmentos de señal adecuados incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción o la localización de un polipéptido definido en la presente. Los segmentos señal preferidos incluyen, pero en un sentido no limitativo, el péptido señal de *Nicotiana glauca* (US 5.939.288), la señal de la extensina de tabaco o la señal de la proteína de unión a cuerpos oleosos de la oleosina de soja. Las moléculas recombinantes también pueden incluir secuencias intervinientes y/o no traducidas que rodean y/o que se encuentran dentro de las secuencias de ácidos nucleicos de las moléculas de ácidos nucleicos definidas en la presente.

Para facilitar la identificación de los transformantes, la construcción de ácidos nucleicos comprende preferentemente un gen marcador seleccionable o rastreable, como o además del polinucleótido extraño o exógeno. Un "gen marcador" se refiere a un gen que imparte un fenotipo distinto a las células que expresan al gen marcador y por consiguiente permite diferenciar dicha célula transformada de las células que no contienen al marcador. Un gen marcador seleccionable confiere una característica que se puede "seleccionar" basado en la resistencia a un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida, un antibiótico, radiación, calor u otro tratamiento capaz de dañar células no transformadas). Un gen marcador rastreable (o gen informante) confiere un rasgo que se pueda identificar por observación o evaluación, es decir, mediante un "examen" (por ejemplo,  $\beta$ -glucuronidasa, luciferasa, GFP u otra actividad enzimática que no está presente en células no transformadas). El gen marcador y la secuencia de nucleótidos de interés no tienen que estar unidos. La elección real de un marcador no es crucial en tanto sea funcional (es decir, selectivo) en combinación con las células de elección, tal como una célula vegetal. El gen marcador y el polinucleótido extraño o exógeno de interés no tienen que estar unidos, dado que la co-transformación de genes no ligados como se describe, por ejemplo, en la US 4.399.216 también constituye un proceso eficiente en la transformación de plantas.

Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol o tetraciclina, preferentemente resistencia a kanamicina. Los ejemplos de marcadores seleccionables para la selección de transformantes de plantas incluyen, pero en un sentido no limitativo, un gen *hyg* que codifica resistencia a higromicina B; un gen de neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina, paromomicina, G418; un gen de glutatión-S-transferasa de hígado de rata que confiere resistencia a herbicidas derivados de glutatión como se describe, por ejemplo, en EP 256223; un gen de la glutamina sintetasa que confiere, con la sobreexpresión, resistencia a los inhibidores de la glutamina sintetasa tal como fosfinotricina como se describe, por ejemplo, en WO 87/05327, un gen de la acetiltransferasa de *Streptomyces viridochromogenes* que confiere resistencia al agente selectivo de fosfinotricina como se describe, por ejemplo, en EP 275957, un gen que codifica una 5-enolshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere tolerancia a N-fosfonometilglucina como describen, por ejemplo, Hinchee et al., (1988), un gen *bar* que confiere resistencia contra bialafos como se describe, por ejemplo, en WO91/02071; un gen de nitrilasa tal como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker et al., 1988); un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que confiere resistencia a metotrexato (Thillet et al., 1988); un gen mutante de

acetolactato sintasa (ALS), que confiere resistencia a imidazolinona, sulfonilurea u otras sustancias químicas inhibitoras de ALS (EP 154,204); un gen mutado de la antranilato sintasa que confiere resistencia a 5-metilriptofano; o un gen de dalapón deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida.

5 Los marcadores rastreables preferidos incluyen, pero en un sentido no limitativo, un gen *uidA* que codifica una enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) para la cual se conocen diversos sustratos cromogénicos, un gen de  $\beta$ -galactosidasa que codifica una enzima para la cual se conocen sustratos cromogénicos, un gen de aecurina (Prasher et al., 1985), que se puede emplear en la detección de bioluminiscencia sensible a calcio; un gen de la proteína fluorescente verde (Niedz et al., 1995) o derivados de los mismos; un gen de la luciferasa (*luc*) (Ow et al., 1986), que permite la  
10 detección de bioluminiscencia y otros conocidos en el arte. Una "molécula informante" Como se usa en el presente documento memoria descriptiva se refiere a una molécula que, debido a su naturaleza química, suministra una señal analíticamente identificable que facilita la determinación de la actividad promotora por referencia a un producto proteico.

15 Preferentemente, la construcción de ácidos nucleicos se incorpora de manera estable en el genoma de la célula, tal como la célula vegetal. Por lo tanto, el ácido nucleico puede comprender elementos apropiados que permiten incorporar la molécula en el genoma, o la construcción se ubica en un vector apropiado que se puede incorporar en un cromosoma de la célula.

## 20 Expresión

Como se usa en el presente documento, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN que tiene la capacidad de transformar una célula hospedadora y de lograr la expresión de una o más moléculas de polinucleótidos específicas. Preferentemente, el vector de expresión también permite la replicación dentro de una célula  
25 hospedadora. Los vectores de expresión pueden ser procariotas o eucariotas, y normalmente son virus o plásmidos. Los vectores de expresión de la presente invención incluyen cualquier vector que funciona (es decir, expresión directa de genes) en células recombinantes de la presente invención, incluyendo en células bacterianas, fúngicas, de endoparásitos, de artrópodos, de animales y vegetales. Los vectores de expresión particularmente preferidos de la presente invención pueden dirigir la expresión de genes en células de levadura y/o vegetales.

30 Los vectores de expresión de la presente invención contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de las moléculas de polinucleótidos de la presente invención. En particular, los polinucleótidos o vectores de la presente invención incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el comienzo, la elongación y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el comienzo de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células  
40 recombinantes de la presente invención. La elección de las secuencias reguladoras usadas depende del organismo blanco, tal como una planta y/u órgano blanco o tejido de interés. Dichas secuencias reguladoras se pueden obtener de cualquier organismo eucariota tal como plantas o virus de plantas, o se pueden sintetizar químicamente. Los especialistas en el arte conocen una gran variedad de tales secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente preferidas son promotores activos en la dirección de la transcripción en plantas, ya sea constitutivamente o específicos de etapa y/o tejidos, dependiendo del uso de la  
45 planta o de partes de la misma.

Se han descrito numerosos vectores adecuados para una transfección estable de células vegetales o para establecer plantas transgénicas, por ejemplo, en Pouwels *et al.*, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supl. 50 1987; Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989; y Gelvin *et al.*, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Normalmente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control de transcripción de secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión en plantas también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora que controla una expresión inducible o constitutiva, regulada por el medio ambiente o por el desarrollo o específica de células o tejidos), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Se han descrito numerosos promotores constitutivos que son activos en células vegetales. Los promotores adecuados para una expresión constitutiva en plantas incluyen, pero en un sentido no limitativo, el promotor 35S del virus en mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor del 35S virus en mosaico de la escrofularia (FMV), el promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar, el promotor del virus moteado amarillo de la comelina, el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bi-fosfatocarboxilasa, el promotor de la triosafosfato isomerasa citosólica de arroz, el promotor de la adenina fosforibosiltransferasa de *Arabidopsis*, el promotor del gen de la actina 1 de arroz, los promotores de la manopina sintasa y octopina sintasa, el promotor Adh, el promotor de la sacarosa sintasa, el promotor del complejo del gen R y el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila  $\alpha/\beta$ .

Estos promotores se han usado para crear vectores de ADN que se han expresado en plantas; véase, por ejemplo, WO 84/02913. Todos estos promotores se han usado para crear diversos tipos de vectores de ADN recombinantes de expresión en plantas.

5 Con el fin de obtener expresión en los tejidos fuente de la planta, tal como hojas, semillas, raíz o tallo, se prefiere que los promotores utilizados en la presente invención sean de una expresión relativamente alta en estos tejidos específicos. Para este fin, se puede elegir entre una cantidad de promotores para genes con expresión específica o mejorada para tejidos o células. Los ejemplos de tales promotores informados en la literatura incluyen el promotor GS2 de la glutamina sintetasa de cloroplasto de arveja, el promotor de la fructosa-1,6-bifosfatasa de cloroplastos de trigo, el promotor ST-LS1 fotosintética nuclear de patata, el promotor de serina/treonina quinasa y el promotor de glucoamilasa (CHS) de *Arabidopsis thaliana*. También se informaron como activos en los tejidos fotosintéticamente activos al promotor de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa del alerce del este (*Larix laricina*), el promotor del gen Cab, Cab6, de pino, el promotor del gen Cab-1 de trigo, el promotor del gen Cab-1 de espinaca, el promotor del gen Cab 1R de arroz, el promotor del gen de piruvato, el promotor de ortofosfato diquinasa (PPDK) de *Zea mays*, el promotor del gen Lhcb1\*2 de tabaco, el promotor Suc2 sacarosa-H<sup>30</sup> symporter de *Arabidopsis thaliana* y el promotor de los genes de proteínas de la membrana tilacoide de espinaca (PsaD, PsaF, PsaE, PC, FNR, AtpC, AtpD, Cab, RbcS).

20 También se pueden utilizar otros promotores de las proteínas de unión a clorofila  $\alpha/\beta$  en la presente invención, tales como los promotores del gen LhcB y del gen PsbP de mostaza blanca (*Sinapis alba*). Hay varios promotores de genes vegetales que son regulados como respuesta a señales del medio ambiente, hormonales, sustancias químicas y/o del desarrollo que también se pueden usar para la expresión de genes de proteínas de unión a ARN en células vegetales, incluyendo promotores regulados por (1) calor, (2) luz (por ejemplo, el promotor RbcS-3A de arveja, el promotor RbcS de maíz); (3) hormonas, tales como ácido abscísico, (4) lesiones (por ejemplo, WunI); o (5) sustancias químicas, tal como jasmonato de metilo, ácido salicílico, hormonas esteroides, alcohol, protectores (WO 97/06269) o también puede ser ventajoso emplear (6) promotores específicos de órganos.

30 Como se usa en el presente documento, el término "promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta" se refiere a un promotor que preferencialmente, en comparación con otros tejidos vegetales, dirige la transcripción de genes en un órgano de almacenamiento de una planta. Preferentemente, el promotor solamente dirige la expresión de un gen de interés en el órgano de almacenamiento y/o la expresión del gen de interés en otras partes de la planta, tal como las hojas, no es detectable mediante un análisis de transferencia Northern y/o RT-PCR. Normalmente, el promotor dirige la expresión de genes durante el crecimiento y desarrollo del órgano de almacenamiento, en particular durante la fase de síntesis y acumulación de compuestos de almacenamiento en el órgano de almacenamiento. Tales promotores pueden dirigir la expresión de genes en todo el órgano de almacenamiento de una planta o solamente en una parte del mismo, tal como el recubrimiento, el embrión o los cotiledones en semillas de plantas dicotiledóneas o el endosperma o la capa de aleurona de semillas de plantas monocotiledóneas.

40 Con el fin de obtener expresión en los tejidos de almacenamiento o reserva de la planta, tales como el tubérculo de la planta de patata, el fruto de tomate o las semillas de soja, canola, algodón, *Zea mays*, trigo, arroz y cebada, se prefiere que los promotores utilizados en la invención tengan una expresión relativamente alta en estos tejidos específicos. Se conocen numerosos promotores de genes con expresión específica o mejorada en tubérculos, incluyendo el promotor de patatina de clase I, el promotor para los genes ADPGPP de tubérculos de patata, ambas subunidades grande y pequeña, el promotor de sacarosa sintasa, el promotor de las proteínas mayores de tubérculos incluyendo los complejos proteicos de 22 kD e inhibidores de proteinasas, el promotor para el gen de la almidón sintasa unida a gránulos (GBSS) y otros promotores de patatinas de clase I y II. También se pueden emplear otros promotores para expresar una proteína en tejidos específicos, tales como semillas o frutas. Se puede usar el promotor de la  $\beta$ -conglucina u otros promotores específicos de semillas tales como los promotores de napina, zeína, linina y faseolina. También se pueden usar promotores específicos de raíces. Un ejemplo de un promotor tal es el promotor del gen de la ácido quitinasa. La expresión en los tejidos de la raíz también se podría lograr utilizando los subdominios específicos de la raíz del promotor CaMV 35S que han sido identificados.

55 En una realización particularmente preferida, el promotor dirige la expresión en tejidos y órganos en los cuales tiene lugar la biosíntesis de ácidos grasos y aceites. Dichos promotores actúan en el desarrollo de las semillas en el momento adecuado para modificar la composición del aceite en las semillas.

60 En una realización particularmente preferida adicional, y en algunos aspectos de la invención, el promotor es un promotor específico de los órganos de almacenamiento de una planta. En un aspecto, el promotor específico del órgano de almacenamiento vegetal es un promotor específico de semillas. En un aspecto más preferida, el promotor dirige preferencialmente la expresión en los cotiledones de una planta dicotiledónea o en el endosperma de una planta monocotiledónea, con relación a la expresión en el embrión de la semilla o con relación a otros órganos en la planta, tal como las hojas. Los promotores preferidos para una expresión específica de semillas incluyen i) promotores de los genes que codifican las enzimas relacionadas con la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos en semillas, tales como desaturasas y elongasas, ii) promotores de los genes que codifican proteínas de almacenamiento en semillas y iii) promotores de los genes que codifican las enzimas relacionadas con la biosíntesis

y acumulación de carbohidratos en semillas. Los promotores específicos de semillas que son adecuados comprenden el promotor del gen de napina de colza oleaginosa (US 5.608.152), el promotor de USP de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (WO 98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5.504.200), el promotor Bce4 de *Brassica* (WO 91/13980) o el promotor de legumina B4 (Baumlein et al., 1992) y los promotores que conducen a la expresión específica de semillas en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y semejantes. Los promotores notables que son adecuados son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores que se describen en el documento WO 99/16890 (promotores del gen de la hordeína de cebada, el gen de glutelina de arroz, el gen de orizina de arroz, el gen de prolamina de arroz, el gen de gliadina de trigo, el gen de glutelina de trigo, el gen de zeína de maíz, el gen de glutelina de avena, el gen de kasirina de sorgo, el gen de secalina de centeno). Otros promotores incluyen los que se describen en Broun et al., (1998), Potenza et al., (2004), US 20070192902 y US 20030159173. En un aspecto, el promotor específico de semillas se expresa preferencialmente en partes definidas de las semillas tales como en los cotiledones o en el endosperma. Los ejemplos de promotores específicos de cotiledones incluyen, pero en un sentido no limitativo, el promotor de FP1 (Ellerstrom et al., 1996), el promotor de legumina de arveja (Perrin et al., 2000) y el promotor de fitohemaglutina de haba (Perrin et al., 2000). Los ejemplos de promotores específicos del endosperma incluyen, pero en un sentido no limitativo, el promotor de zeína-1 de maíz (Chikwamba et al., 2003), el promotor de glutelina-1 de arroz (Yang et al., 2003), el promotor de D-hordeína de cebada (Horvath et al., 2000) y los promotores de HMW glutenina de trigo (Alvarez et al., 2000). En un aspecto adicional, el promotor específico de semillas no se expresa, o solamente se expresa a un nivel bajo, en el embrión y/o después que germinó la semilla.

En otra realización, el promotor específico del órgano de almacenamiento vegetal es un promotor específico de tubérculos. Los ejemplos incluyen, pero en un sentido no limitativo, los promotores B33, PAT21 y GBSS de patatina de patata, así como el promotor de esporamina de batata (por una revisión véase Potenza et al., 2004). En un aspecto preferido, el promotor dirige la expresión preferencialmente en la médula del tubérculo, con relación a las capas externas (piel, corteza) o el embrión del tubérculo.

En otra realización, el promotor específico del órgano de almacenamiento vegetal es un promotor específico de frutos. Los ejemplos incluyen, pero en un sentido no limitativo, los promotores E8 y Pds de la poligalacturonasa de tomate, así como el promotor ACC oxidasa de manzana (por una revisión véase Potenza et al., 2004). En un aspecto preferido, el promotor dirige preferencialmente la expresión en las partes comestibles de la fruta, por ejemplo la médula de la fruta, con relación a la piel de la fruta o las semillas dentro del fruto.

La secuencia directriz no traducida 5' puede derivar del promotor seleccionado para expresar la secuencia del gen heterólogo del polinucleótido de la presente invención o puede ser heteróloga con respecto a la región codificante de la enzima a producir y se puede modificar específicamente, si se desea, para incrementar la traducción del ARNm. Por una revisión sobre la optimización de la expresión de transgenes, véase Koziel et al., (1996). Las regiones no traducidas 5' también se pueden obtener de los ARN víricos de plantas (virus en mosaico del tabaco, virus del grabado de la hoja de tabaco, virus en mosaico enano de maíz, virus en mosaico enano de alfalfa, entre otros), de genes eucariotas adecuados, de genes vegetales (directriz del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de trigo y maíz) o de una secuencia genética sintética. La presente invención no se limita a las construcciones en donde la región no traducida deriva de la secuencia no traducida 5' que acompaña a la secuencia del promotor. La secuencia directriz también podría derivar de una secuencia codificante o de un promotor no relacionado. Las secuencias directrices de utilidad en el contexto de la presente invención comprenden la directriz Hsp70 de maíz (US 5.362.865 y US 5.859.347) y el elemento TMV omega ejemplificado en el Ejemplo 8.

La terminación de transcripción se efectúa con una secuencia de ADN no traducida 3' ligada operativamente en el vector quimérico al polinucleótido de interés. La región no traducida 3' de una molécula de ADN recombinante contiene una señal de poliadenilación cuya función en plantas causa la adición de nucleótidos adenilato al extremo 3' del ARN. La región no traducida 3' se puede obtener de diversos genes que se expresan en células vegetales. La región no traducida 3' de la nopalina sintasa, la región no traducida 3' del gen de la subunidad pequeña Rubisco de arveja, la región no traducida 3' de la proteína de almacenamiento 7S de soja en genes de semillas son de uso común en este sentido. También son adecuadas las regiones no traducidas transcritas 3', que contienen la señal de poliadenilato de los genes del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium*.

Se pueden usar tecnologías de ADN recombinante para mejorar la expresión de una molécula de polinucleótidos transformada mediante manipulación, por ejemplo, la cantidad de copias de la molécula de polinucleótidos dentro de una célula hospedadora, la eficacia con la cual se transcriben dichas moléculas de polinucleótidos, la eficacia con que se traducen los transcritos resultantes y la eficacia de las modificaciones de post-traducción. Las técnicas recombinantes de utilidad para incrementar la expresión de las moléculas de polinucleótidos definidas en la presente incluyen, pero en un sentido no limitativo, unión operativa de moléculas de polinucleótidos a plásmidos con un gran número de copias, integración de la molécula de polinucleótidos en uno o más cromosomas de células hospedadoras, adición de secuencias estabilizadoras del vector a los plásmidos, sustituciones o modificaciones de las señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de las señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de las moléculas de polinucleótidos para que se correspondan con la utilización de

codones de la célula hospedadora y supresión de las secuencias que desestabilizan a los transcritos.

#### Ácidos nucleicos de transferencia

5 Los ácidos nucleicos de transferencia de la invención comprenden al menos una, preferentemente dos, secuencias de bordes y un polinucleótido exógeno. El ácido nucleico de transferencia puede codificar, o no, un marcador seleccionable. Preferentemente, el ácido nucleico de transferencia forma parte de un vector binario en la bacteria, donde dicho vector binario comprende además elementos que permiten la replicación del vector en la bacteria o permite la selección o conservación de células bacterianas que contienen al vector. Con la transferencia a una célula eucariota, el componente de ácido nucleico de transferencia del vector binario tiene la capacidad de integrarse en el genoma de la célula eucariota.

15 Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico de transferencia extracromosómico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene la capacidad de poder ser transferida de una bacteria, tal como *Agrobacterium sp.*, a una célula eucariota, tal como una célula foliar vegetal. Un ácido nucleico de transferencia extracromosómico es un elemento genético reconocido como un elemento que puede ser transferido con la subsiguiente integración de la secuencia de nucleótidos contenida dentro de sus bordes en el genoma de la célula receptora. En este sentido, un ácido nucleico de transferencia normalmente está flanqueado por dos secuencias de "bordes", aunque en algunos casos se puede usar un solo borde por uno de los extremos y el segundo extremo del ácido nucleico transferido es generado aleatoriamente en el proceso de transferencia. Un polinucleótido exógeno deseado se ubica normalmente entre la secuencia tipo borde izquierdo y la secuencia tipo borde derecho de un ácido nucleico de transferencia. El polinucleótido deseado contenido dentro del ácido nucleico de transferencia se puede ligar operativamente a varios diferentes elementos reguladores promotores y terminadores que facilitan su expresión, es decir, la transcripción y/o traducción del polinucleótido. Los ADN-T de *Agrobacterium sp.* tal como de *Agrobacterium tumefaciens* o de *Agrobacterium rhizogenes*, y variantes/mutantes de los mismos elaboradas por el hombre son probablemente los ejemplos mejor caracterizados de ácidos nucleicos de transferencia. Otro ejemplo es el ADN-P ("ADN de plantas") que comprende secuencias tipo borde de ADN-T de plantas.

30 Como se usa en el presente documento, "ADN-T" se refiere, por ejemplo, al ADN-T de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o de un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*, o variantes de los mismos elaboradas por el hombre que funcionan como ADN-T (ADN transferido). El ADN-T puede comprender un ADN-T completo incluyendo ambas secuencias de bordes derecho e izquierdo, pero solamente es necesario que comprenda las secuencias mínimas requeridas en *cis* para la transferencia, es decir, la secuencia del borde derecho y de ADN-T. En los ADN-T de la invención se han insertado, en cualquier parte entre las secuencias de bordes derecho e izquierdo (si está presente), el polinucleótido exógeno flanqueado por sitios blanco para una recombinasa específica del sitio. Las secuencias que codifican los factores requeridos en *trans* para la transferencia del ADN-T en una célula vegetal, tal como los genes *vir*, se pueden insertar en el ADN-T o pueden estar presentes sobre el mismo replicón que el ADN-T o preferentemente se encuentran en *trans* sobre un replicón compatible en el huésped de *Agrobacterium*. Dichos "sistemas de vectores binarios" son bien conocidos en el arte.

40 Como se usa en el presente documento, el "ADN-P" se refiere a un ácido nucleico de transferencia aislado de un genoma vegetal, o variantes/mutantes del mismo elaborado por el hombre, y comprende por cada extremo, o por un solo extremo, una secuencia tipo borde de ADN-T. La secuencia tipo borde comparte preferentemente al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %, pero menos que un 100 % de identidad de secuencia, con una secuencia de borde de ADN-T de *Agrobacterium sp.*, tal como de *Agrobacterium tumefaciens* o de *Agrobacterium rhizogenes*. Por consiguiente, se pueden usar ADN-P en lugar de ADN-T para transferir una secuencia de nucleótidos contenida en el ADN-P, por ejemplo de *Agrobacterium* a otra célula. El ADN-P, antes de la inserción del polinucleótido exógeno que será transferido, puede modificarse para facilitar la clonación y preferentemente no debería codificar ninguna proteína. El ADN-P se caracteriza por contener al menos una secuencia de borde derecho y preferentemente también una secuencia de borde izquierdo.

55 Como se usa en el presente documento, las secuencias de "bordes" de un ácido nucleico de transferencia se pueden aislar de un organismo seleccionado, tal como una planta o bacteria, o puede ser una variante/mutante de la misma elaborada por el hombre. La secuencia del borde promueve y facilita la transferencia del polinucleótido exógeno con el cual está ligado y puede facilitar su integración en el genoma de la célula receptora.

60 En un aspecto, una secuencia de borde es de entre 5-100 bp de longitud, 10-80 bp de longitud, 15-75 bp de longitud, 15-60 bp de longitud, 15-50 bp de longitud, 15-40 bp de longitud, 15-30 bp de longitud, 16-30 bp de longitud, 20-30 bp de longitud, 21-30 bp de longitud, 22-30 bp de longitud, 23-30 bp de longitud, 24-30 bp de longitud, 25-30 bp de longitud o 26-30 bp de longitud.

65 Las secuencias de bordes del ADN-T de *Agrobacterium sp.* son bien conocidas en el arte e incluyen los que se describen en Lacroix et al. (2008), Tzfira y Citovsky (2006) y Glevin (2003). Las secuencias de bordes de ADN-P se pueden aislar de cualquier planta, tal como de patata y trigo. En un aspecto, el ADN-P tiene la secuencia de ácido nucleico ANGATNTATN6GT (SEQ ID NO:109), donde "N" es cualquier nucleótido, tal como los representados por "A", "G", "C" o "T". Los ejemplos de otras secuencias de bordes de utilidad para la invención incluyen, pero en un

sentido no limitativo,

5 TGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC (SEQ ID NO:110);  
 TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAAC (SEQ ID NO:111);  
 TGGCAGGATATATACCGTTGTAATT (SEQ ID NO:112);  
 CGGCAGGATATATTCAATTGTAATT (SEQ ID NO:113);  
 TGGTAGGATATATACCGTTGTAATT (SEQ ID NO:114);  
 TGGCAGGATATATGGTACTGTAATT (SEQ ID NO:115);  
 10 YGRYAGGATATATWSNVBKGTAAWY (SEQ ID NO:116);  
 CGGCAGGATATATCCTGATGTAAAT (SEQ ID NO:117);  
 TGGCAGGAGTTATTCCGAGGGTAAAC (SEQ ID NO:118);  
 TGACAGGATATATCGTGATGTCAAC (SEQ ID NO:119);  
 GGAAGTACATATTGGCGGGTAAAC (SEQ ID NO:120);  
 15 TTACAGGATATATTAATATGTATGA (SEQ ID NO:121);  
 TAAATGATATATTCCCTTGTAAT (SEQ ID NO:122);  
 TGACAGGATATATGGTAATGTAAAC (SEQ ID NO:123); y  
 TGGCAGGATATATACCGATGTAAAC (SEQ ID NO:124),

20 donde \* Y = C o T; R = A o G; K = G o T; W = A o T; S = C o G; V = A, C, o G; B = C, G o T.

Si bien tradicionalmente sólo se ha usado *Agrobacterium sp.* para transferir genes a células vegetales, existe ahora una gran cantidad de sistemas que fueron identificados/desarrollados y que actúan de una manera similar a *Agrobacterium sp.* Recientemente se han modificado genéticamente varias especies distintas de *Agrobacterium* para que sean competentes para la transferencia de genes (Chung et al., 2006; Broothaerts et al., 2005). Estas especies incluyen *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meliloti* y *Mezorhizobium loti*. Las bacterias se hacen competentes para la transferencia de genes proporcionándoles a las bacterias la maquinaria necesaria para el proceso de transformación: es decir un conjunto de genes de virulencia codificado por un plásmido Ti de *Agrobacterium* y el segmento de ADN-T que reside sobre un pequeño plásmido binario separado. Las bacterias manipuladas de esta manera tienen la capacidad de transformar diferentes tejidos vegetales (tejido de discos de hoja, callos y oval), de monocotiledóneas o dicotiledóneas, y de diversas especies vegetales diferentes (por ejemplo, tabaco, arroz).

La transferencia directa de plásmidos de expresión eucariotas de bacterias a huéspedes eucariotas se logró por primera vez hace varias décadas por fusión de células de mamífero y protoplastos de *Escherichia coli* portadores de plásmidos (Schaffner, 1980). Desde entonces, ha ido aumentando de manera constante la cantidad de bacterias capaces de distribuir genes en células de mamífero (Weiss, 2003), habiendo sido descubiertos por cuatro grupos de forma independiente (Sizemore et al., 1995; Courvalin et al., 1995; Powell et al., 1996; Darji et al., 1997).

Se ha demostrado que *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* o *E. coli* atenuadas que se volvieron invasivas por el plásmido de virulencia (pWR100) de *S. flexneri* pueden transferir plásmidos de expresión después de la invasión en células hospedadoras y muerte intracelular debido a una atenuación metabólica. La aplicación en mucosas, ya sea por vía nasal u oral, de tales organismos recombinantes de *Shigella* o *Salmonella* indujo respuestas inmunes contra el antígeno codificado por los plásmidos de expresión. Mientras tanto, se había más que duplicado la lista de bacterias capaces de transferir plásmidos de expresión a células hospedadoras de mamífero *in vitro* e *in vivo* y fue documentado para *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* (Fennelly et al., 1999; Shiau et al., 2001; Dietrich et al., 1998, 2001; Hense et al., 2001; Al-Mariri et al., 2002).

En general, se podría asumir que todas las bacterias capaces de ingresar en el citosol de la célula hospedadora (como *S. flexneri* o *L. monocytogenes*) y lisarse dentro de este compartimento celular, deberían poder transferir ADN. Esto se conoce como una invasión 'abortiva' o 'suicida' ya que las bacterias deben lisarse para que tenga lugar la transferencia de ADN (Grillot-Courvalin et al., 1999). Además, aún muchas de las bacterias que permanecen en la vacuola fagocítica (como *S. typhimurium*) también podrían hacerlo. Por consiguiente, las cepas de laboratorio recombinantes de *E. coli* que han sido manipuladas para ser invasivas pero incapaces de un escape fagosómico, podrían no obstante distribuir su carga de plásmidos en el núcleo de la célula de mamífero infectada (Grillot-Courvalin et al., 1998). Además, recientemente también se ha demostrado que *Agrobacterium tumefaciens* puede introducir transgenes en células de mamífero (Kunik et al., 2001).

El proceso de transferencia que emplea elementos de transferencia extracromosómicos normalmente transfiere múltiples copias del elemento a la célula receptora. Como se usa en el presente documento, el término "transfectado transitoriamente" significa que, aunque algunos de los polinucleótidos exógenos se pueden integrar de forma estable en el genoma de la célula, las células no se seleccionan por una integración estable. Como resultado de ello, gran parte del ácido nucleico de transferencia permanece en una ubicación extracromosómica en la célula, por ejemplo, más del 90 % de las copias del polinucleótido exógeno que fueron transferidos a la célula receptora no se integra en el genoma.

Como se usa en el presente documento, los términos "transfección", "transformación" y variaciones de los mismos en general se usan indistintamente. Las células "transfectadas" o "transformadas" pueden haber sido manipuladas

para introducir el o los polinucleótidos exógenos, o pueden ser células de la progenie derivadas de ellas.

#### Células recombinantes

La invención también proporciona una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal recombinante, que es una célula hospedadora transformada con una o más moléculas recombinantes, tales como los polinucleótidos, los ADN quiméricos o los vectores recombinantes definidos en el presente documento. La célula recombinante puede comprender cualquier combinación de los mismos, tal como dos o tres vectores recombinantes o un vector recombinante y uno o más polinucleótidos o ADN quiméricos adicionales. Las células adecuadas de la invención incluyen cualquier célula que se pueda transformar con un polinucleótido, un ADN quimérico o un vector recombinante de la invención, tal como por ejemplo, una molécula que codifican un polipéptido o una enzima descrita en la presente. La célula es preferentemente una célula que de esa manera se pueda usar para producir LC-PUFA. La célula recombinante puede ser una célula en cultivo, una célula *in vitro* o presente en un organismo, tal como por ejemplo una planta, o en un órgano, tal como por ejemplo una semilla o una hoja. Preferentemente, la célula se encuentra en una planta, más preferentemente en la semilla de una planta.

Las células hospedadoras en las cuales se introducen los polinucleótido pueden ser células no transformadas o células que ya fueron transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico. Dichas moléculas de ácidos nucleicos pueden estar relacionadas, o no, con la síntesis de LC-PUFA. Las células hospedadoras de la presente invención pueden tener capacidad endógena (es decir, natural) de producir las proteínas definidas en la presente, en cuyo caso la célula recombinante derivada de las mismas tienen una mayor capacidad para producir los polipéptidos, o pueden tener la capacidad de producir tales proteínas solamente después de su transformación con al menos un polinucleótido de la invención. En un aspecto, una célula recombinante de la invención tiene una mayor capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Como se usa en el presente documento, el término "célula con una mayor capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga" es un término relativo donde la célula recombinante de la invención se compara con una célula hospedadora que no contiene a los polinucleótidos de la invención, con una célula recombinante que produce más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados o una mayor concentración de LC-PUFA tal como EPA, DPA o DHA (con relación a otros ácidos grasos), que la célula nativa. La célula con una mayor capacidad para sintetizar otro producto, tal como por ejemplo otro ácido graso, un lípido, un carbohidrato tal como almidón, una molécula de ARN, un polipéptido, un compuesto farmacéutico u otro producto tiene un significado correspondiente.

Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una de las proteínas descritas en la presente, e incluyen células bacterianas, fúngicas (incluyendo de levadura), de parásitos, de artrópodo, de animales y vegetales. Las células pueden ser procariontas o eucariotas. Las células hospedadoras preferidas son células de levadura y vegetales. En un aspecto preferido, la célula vegetal es una célula de semilla, en particular una célula del cotiledón o endosperma de una semilla. En un aspecto, la célula es una célula de animal o una célula de un alga. La célula animal puede ser de cualquier tipo de animal tal como, por ejemplo, una célula de un animal no humano, una célula de un vertebrado no humano, una célula de mamífero no humano o células de animales acuáticos tales como, peces o crustáceos, invertebrados, insectos, etc. Los ejemplos no limitativos de células de artrópodos incluyen células de insecto, tal como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni* y células S2 de *Drosophila*. Un ejemplo de una célula bacteriana de utilidad como una célula hospedadora de la presente invención es de *Synechococcus* spp. (también conocida como *Synechocystis* spp.), por ejemplo *Synechococcus elongatus*.

Las células pueden ser de un organismo adecuado para un proceso de fermentación. Como se usa en el presente documento, el término "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o a cualquier proceso que comprende un paso de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, en un sentido no limitativo, los procesos de fermentación usados para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánico (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, beta-caroteno); y hormonas. Los procesos de fermentación también incluyen los procesos de fermentación usados en la industria de alcohol de consumo (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Los procesos de fermentación preferidos incluyen los procesos de fermentación de alcoholes, bien conocidos en el arte. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, bien conocidos en el arte. Las células fermentadoras adecuadas, normalmente microorganismos, tienen la capacidad de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de microorganismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. Como se usa en el presente documento, una "levadura" incluye *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Candida* spp., *Kluveromyces* spp., *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Trichoderma* spp., *Lipomyces starkey* y *Yarrowia lipolitica*. Las levaduras preferidas incluyen cepas de *Saccharomyces* spp., y en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Plantas transgénicas

La invención también provee una planta que comprende una célula de la invención, tal como una planta transgénica

que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. El término "planta", cuando se usa en la presente como un sustantivo, se refiere a plantas completas, pero cuando se usa como adjetivo se refiere a cualquier sustancia que está presente, se obtiene, deriva de o está relacionada con una planta, tal como por ejemplo, órganos vegetales (por ejemplo hojas, tallos, raíces, flores), células individuales (por ejemplo polen), semillas, células vegetales y semejantes. El término "parte de planta" se refiere a todas las partes de planta que comprenden el ADN vegetal, incluyendo estructuras vegetativas tal como, por ejemplo, hojas o tallos, raíces, órganos o estructuras florales, polen, semillas, partes de semillas tal como un embrión, endosperma, escutelo o recubrimiento de semilla, tejido vegetal tal como, por ejemplo, el tejido vascular, células y progenie de las mismas.

Una "planta transgénica", una "planta modificada genéticamente" o variaciones de las mismas, se refieren a una planta que contiene una construcción genética ("transgén") que no se encuentra en una planta de tipo salvaje de la misma especie, variedad o cultivar. Las plantas transgénicas definidas en el contexto de la presente invención incluyen plantas y su progenie que han sido modificadas genéticamente usando técnicas recombinantes para producir al menos un polipéptido definido en la presente en la planta u órgano vegetal deseado. Las células vegetales transgénicas y las partes de plantas transgénicas tienen los significados correspondientes. Un "transgén" al que se hace referencia en la presente tiene el significado normal en el arte de la biotecnología e incluye una secuencia genética que fue producida o alterada mediante tecnología de ADN o ARN recombinante y que fue introducida en una célula de la invención, preferentemente una célula vegetal. El transgén puede incluir secuencias genéticas derivadas de una célula vegetal que puede ser de la misma especie, variedad o cultivar que la célula vegetal en la cual se introduce el transgén o puede ser de una especie, variedad o cultivar diferente o de una célula distinta de una célula vegetal. Normalmente, el transgén fue introducido en la célula, tal como una planta, mediante manipulación humana tal como, por ejemplo por transformación, pero se puede usar cualquier método reconocido por los especialistas en el arte.

Los términos "semilla" y "grano" se usan indistintamente en la presente. Un "grano" se refiere a un grano maduro, tal como un grano cosechado o un grano que aún se encuentra sobre la planta pero que está listo para ser cosechado, y también se refiere a un grano después de embeberlo o hacerlo germinar, según el contexto. Los granos maduros comúnmente tienen un contenido de humedad menor que un 18-20 % aproximadamente. Una "semilla en desarrollo", Como se usa en el presente documento, se refiere a una semilla antes de la madurez, normalmente presente en las estructuras reproductoras de la planta después de la fertilización o anthesis, pero también se refieren a las semillas antes de la madurez que se pueden aislar de la planta.

Como se usa en el presente documento, el término "órgano de almacenamiento de una planta" se refiere a una parte de una planta especializada en guardar energía en la forma de, por ejemplo, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y/o aceites. Los ejemplos de órganos de almacenamiento de una planta son semillas, frutos, raíces tuberosas y tubérculos. Un órgano de almacenamiento preferido de una planta de la invención es la semilla.

Como se usa en el presente documento, el término "fenotípicamente normal" se refiere a una planta o a un órgano vegetal, en particular un órgano de almacenamiento tal como una semilla, tubérculo o fruto de la invención modificada genéticamente que no tiene una capacidad significativamente reducida para crecer y reproducirse en comparación con una planta u órgano vegetal no modificado. En un aspecto, la planta u órgano vegetal modificada genéticamente que es fenotípicamente normal comprende un polinucleótido exógeno que codifica un supresor por silenciamiento ligado operativamente a un promotor específico del órgano de almacenamiento de una planta y que tiene la capacidad de crecer o reproducirse, esencialmente igual que una planta u órgano isogénico que no que comprende a dicho polinucleótido. Preferentemente, la biomasa, el índice de crecimiento, índice de germinación, el tamaño de los órganos de almacenamiento, el tamaño de las semillas y/o la cantidad de semillas viables producidas no son menores que un 90 % de los valores de una planta que no contiene a dicho polinucleótido exógeno cuando se cultiva bajo condiciones idénticas. Este término no abarca las características de la planta que pueden ser diferentes de la planta de tipo salvaje pero que no afectan la utilidad de la planta para fines comerciales tal como, por ejemplo, un fenotipo *ballerina* de las hojas de las plántulas.

Las plantas suministradas o contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En formas de realización preferidas, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, patata, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada o arveja) u otras legumbres. Las plantas se pueden cultivar para la producción de raíces, tubérculos, hojas, tallos, flores o frutos comestibles. Las plantas pueden ser verduras o plantas ornamentales. Las plantas de la invención pueden ser: 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*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Lopmoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), ananá (*Anana comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia senensis*), banana (*Musa* spp.), palta (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayava (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), cayú (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha (*Beta vulgaris*), avena o cebada.

En una realización preferida, la planta es una angiosperma.

En una realización, la planta es una planta oleaginosa, preferentemente una planta de cultivo de semillas oleaginosas. Como se usa en el presente documento, una "planta oleaginosa" es una especie vegetal usada en la producción comercial de aceites a partir de las semillas de la planta. La planta oleaginosa puede ser colza oleaginosa (tal como canola), maíz, girasol, soja, sorgo, lino (semillas de lino) o remolacha. Además, la planta oleaginosa puede ser otras *Brassicas*, algodón, maní, amapola, mostaza, semillas de ricino, sésamo, alazor o plantas productoras de nueces. La planta puede producir niveles altos de aceite en sus frutos, tal como olivo, palma oleaginosa o coco. Las plantas de horticultura en las cuales se puede aplicar la presente invención son lechuga, endivia o verduras de *brassicas* incluyendo coles, brócoli o coliflor. La presente invención se puede aplicar en tabaco, cucurbitáceas, zanahorias, frutillas, tomate o pimiento.

En una realización preferida adicional, la planta no transgénica usada para producir una planta transgénica de la invención produce aceite, en especial en las semillas, que tiene i) menos que un 20 %, menos que un 10 % o menos que un 5 % de ácidos grasos 18:2 y/o ii) menos que un 10 % o menos que un 5 % de ácidos grasos 18:3.

En una realización preferida, la planta transgénica es homocigota para cada uno y todos los genes que fueron introducidos (transgén) de modo que su progenie no segregará el fenotipo deseado. La planta transgénica también puede ser heterocigótica para los transgenes introducidos, preferentemente uniformemente heterocigóticas para el transgén, tal como por ejemplo en la progenie F1 que fue cultivada a partir de semillas híbridas. Dichas plantas pueden ofrecer ventajas tales como el vigor híbrido, bien conocido en el arte.

Cuando fuera relevante, las plantas transgénicas también comprenden otros transgenes que codifican enzimas relacionadas con la producción de LC-PUFA tales como, pero en un sentido no limitativo, una  $\Delta 6$  desaturasa, una  $\Delta 9$  elongasa, una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 6$  elongasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\omega 3$  desaturasa, una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  elongasa, una diacilglicerol aciltransferasa, una  $\Delta 17$  desaturasa, una  $\Delta 15$  desaturasa y/o una  $\Delta 12$  desaturasa. Los ejemplos de tales enzimas con una de más de estas actividades son conocidos en el arte e incluyen los que se describen en la presente y en WO 05/103253 (véase, por ejemplo, Tabla 1 de WO 05/103253). En ejemplos específicos, la planta transgénica comprende por lo menos polinucleótidos exógenos que codifican:

- a) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 6$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa y una  $\Delta 6$  elongasa,
- b) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa y una  $\Delta 9$  elongasa,
- c) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 6$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa, una  $\Delta 6$  elongasa y una  $\Delta 15$  desaturasa,
- d) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa, una  $\Delta 9$  elongasa y una  $\Delta 15$  desaturasa,
- e) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 6$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa, una  $\Delta 6$  elongasa y una  $\Delta 17$  desaturasa, o
- f) una  $\Delta 4$  desaturasa, una  $\Delta 5$  desaturasa, una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 5$ □elongasa, una  $\Delta 9$  elongasa y una  $\Delta 17$  desaturasa.

#### *Transformación de plantas*

Las plantas transgénicas se pueden producir usando técnicas conocidas en el arte, tales como las que se describen en general en A. Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), y P. Christou y H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley y Sons (2004).

Como se usa en el presente documento, los términos "transformación de manera estable", "transformado de manera estable" y variaciones de los mismos se refieren a la integración de las moléculas de ácidos nucleicos exógenas en el genoma de la célula de modo tal que son transferidas a las células de la progenie durante la división celular sin necesidad de seleccionar positivamente su presencia. Los transformantes estables, o la progenie de los mismos, se pueden seleccionar con cualquier medio conocido en el arte tales como transferencias Southern con ADN cromosómico o hibridación *in situ* de ADN genómico.

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema de amplia aplicación para introducir genes en células vegetales porque el ADN se puede introducir en las células en tejidos vegetales u órganos vegetales completos o en explantes en cultivo tisular, ya sea para una expresión transitoria o para una integración estable del ADN en el genoma de la célula vegetal. El uso de vectores de integración vegetales mediados por *Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales es bien conocido en el arte (véase, por ejemplo, US 5177010, US 5104310, US 5004863 o US 5159135). La región de ADN a transferir está definida por las secuencias de los bordes, y el ADN que interviene (ADN-T) comúnmente se inserta en el genoma vegetal. Además, la integración del ADN-T es un proceso relativamente preciso que da como resultado unos pocos reordenamientos. En aquellas variedades vegetales donde la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficiente, es el método de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia de genes. Los vectores preferidos para la transformación con *Agrobacterium* tienen la capacidad de replicarse en *E. coli*, así como en *Agrobacterium*, permitiendo manipulaciones convenientes como se

describe en la literatura (Klee et al., En: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn y Schell (editores), Springer-Verlag, Nueva York, págs. 179-203 (1985).

Los métodos de aceleración que se pueden usar incluyen, por ejemplo, bombardeo con microproyectiles y semejantes. Un ejemplo de un método para distribuir moléculas de ácidos nucleicos transformantes en células vegetales es el bombardeo con microproyectiles. Este método ha sido revisado por Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, Inglaterra (1994). Se pueden recubrir partículas no biológicas (microproyectiles) con ácidos nucleicos y distribuir las en las células mediante una fuerza propulsora. Los ejemplos de partículas incluyen las que comprenden tungsteno, oro, platino y semejantes. Una ventaja particular del bombardeo de microproyectiles, además de ser un medio eficaz para transformar monocotiledóneas de manera reproducible, es que no es necesario aislar los protoplastos ni susceptibilidad de una infección por *Agrobacterium*. Una forma de realización ilustrativa de un método para distribuir ADN en células de *Zea mays* por aceleración es un sistema de distribución de partículas  $\alpha$  biolístico, que se puede usar para impulsar partículas recubiertas con ADN a través de una pantalla, tal como una pantalla de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro cubierta con células de maíz cultivadas en suspensión. Un sistema de distribución de partículas adecuado para su uso con la presente invención es la pistola de aceleración por helio PDS-1000/He disponible de Bio-Rad Laboratories.

Para el bombardeo, se pueden concentrar células en suspensión sobre filtros. Los filtros que contienen a las células que serán bombardeadas se ubican a una distancia apropiada debajo de la placa de detención de microproyectiles. Si se deseara, también se pueden colocar una o varias pantallas entre la pistola y las células a bombardear.

Como alternativa, se pueden disponer embriones inmaduros u otras células blanco sobre un medio de cultivo sólido. Las células que serán bombardeadas se ubican a una distancia apropiada debajo de la placa de detención de microproyectiles. Si se deseara, también se coloca una o varias pantallas entre el dispositivo de aceleración y las células que serán bombardeadas. El uso de las técnicas que se describen en este documento permitirá obtener hasta 1000 o más focos de células que expresan de forma transitoria un gen de un marcador rastreable o seleccionable. La cantidad de células de un foco que expresa el producto genético exógeno 48 horas después del bombardeo a menudo varía en un rango de uno a diez, con un promedio de uno a tres.

En la transformación por bombardeo, se pueden optimizar las condiciones de cultivo de pre-bombardeo y los parámetros de bombardeo con el fin de obtener la cantidad máxima de transformantes estables. Tanto los parámetros físicos como biológicos para el bombardeo son importantes en esta tecnología. Los factores físicos son aquellos que comprenden la manipulación del ADN/precipitado de microproyectiles o aquellos que afectan el vuelo y la velocidad de los macro- o microproyectiles. Los factores biológicos incluyen todos los pasos involucrados en la manipulación de las células antes e inmediatamente después del bombardeo, el ajuste osmótico de las células blanco para ayudar a aliviar el trauma asociado con el bombardeo y también la naturaleza del ADN transformante, tal como ADN alineado o plásmidos superenrollados intactos. Se considera que las manipulaciones de pre-bombardeo son especialmente importantes para una transformación exitosa de embriones inmaduros.

En otra realización alternativa, se pueden transformar plástidos de forma estable. Los métodos divulgados para la transformación de plástidos en plantas superiores incluyen distribución con pistola de partículas de ADN que contienen un marcador seleccionable y direccionamiento del ADN al genoma del plástido por medio de recombinación homóloga (US 5, 451.513, US 5.545.818, US 5.877.402, US 5.932.479, y WO 99/05265).

Por consiguiente, se considera que puede ser necesario ajustar diversos aspectos de los parámetros de bombardeo en estudios a pequeña escala para optimizar completamente las condiciones. Puede ser particularmente deseable ajustar los parámetros físicos, tal como la distancia a la hendidura, la distancia de vuelo, la distancia al tejido y la presión de helio. También puede ser conveniente minimizar los factores de reducción de trauma modificando las condiciones que afectan el estado fisiológico de las células receptoras y que por ello pueden afectar la transformación y las eficacias de integración. Por ejemplo, se puede ajustar el estado osmótico, la hidratación del tejido y la etapa de subcultivo o el ciclo celular de las células receptoras para lograr una transformación óptima. La ejecución de otros ajustes de rutina constituye un aspecto conocido para los especialistas en el arte a la luz de la presente descripción.

La transformación de protoplastos vegetales se puede efectuar usando métodos basados en precipitación por fosfato de calcio, tratamiento con polietilenglicol, electroporación y combinaciones de estos tratamientos. La aplicación de estos sistemas a diferentes variedades de plantas depende de la capacidad para regenerar dicha cepa vegetal particular a partir de protoplastos. Se han descrito métodos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

También se pueden usar otros métodos de transformación de células, los cuales incluyen, por ejemplo, la introducción de ADN en plantas mediante la transferencia directa de ADN en el polen, la inyección directa de ADN en los órganos reproductores de una planta o la inyección directa de ADN en las células de embriones inmaduros, seguida por la rehidratación de embriones desecados.

La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de protoplastos transformantes de plantas individuales,

o a partir de varios explantes transformados, son bien conocidos en el arte (Weissbach et al., en: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA (1988)). Este proceso de regeneración y desarrollo normalmente incluye los pasos de selección de las células transformadas, cultivo de aquellas células individualizadas a través de las etapas usuales del desarrollo embrionario, hasta la etapa de plántula con raíz. Los embriones y las semillas transgénicas se regeneran de forma similar. Luego se siembran los brotes con raíces resultantes en un medio apropiado para el cultivo de plantas, tal como tierra.

El desarrollo o la regeneración de plantas que contienen al gen exógeno extraño son bien conocidos en el arte. Preferentemente, las plantas regeneradas son autopolinizadas para proveer plantas transgénicas homocigotas. De lo contrario, se cruza el polen obtenido de las plantas regeneradas con plantas de líneas de importancia agronómica desarrolladas a partir de semillas. Por otro lado, se usa el polen de plantas de estas líneas importantes para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención, que contiene al ácido nucleico exógeno deseado, se cultiva usando métodos bien conocidos por los especialistas en el arte.

Los métodos para transformar dicotiledóneas, primariamente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y obtener plantas transgénicas fueron publicados para algodón (US 5.004.863, US 5.159.135, US 5.518.908); soja (US 5.569.834, US 5.416.011); *Brassica* (US 5.463.174); maní (Cheng et al., 1996); y arveja (Grant et al., 1995).

Los métodos para transformar de plantas de cereales tales como trigo y cebada para introducir una variación genética en la planta por introducción de un ácido nucleico exógeno y para regenerar plantas a partir de protoplastos o de embriones inmaduros de las plantas son bien conocidos en el arte, véanse por ejemplo, CA 2.092.588, AU 61781/94, AU 667939, US 6.100.447, PCT/US97/10621, US 5.589.617, US 6.541.257, y otros métodos se indican en la memoria descriptiva de la Patente WO99/14314. Preferentemente, las plantas transgénicas de trigo o cebada se producen mediante procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. Los vectores que contienen a la construcción de ácidos nucleicos deseada se pueden introducir en células de trigo regenerables de plantas de cultivo tisular o de explantes, o de sistemas vegetales adecuados tales como protoplastos.

Las células de trigo regenerables son preferentemente del escutelo de embriones inmaduros, embriones maduros, callos derivados de los mismos o del tejido meristemático.

Para confirmar la presencia de los transgenes en células y plantas transgénicas, se puede conducir una amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un análisis de transferencia Southern usando métodos conocidos por los especialistas en el arte. Los productos de expresión de los transgenes se pueden detectar en cualquiera de varias maneras, dependiendo de la naturaleza del producto e incluyen transferencia Western y ensayos enzimáticos. Una manera de particular utilidad para cuantificar la expresión de proteínas y para detectar la replicación en diferentes tejidos vegetales comprende usar un gen informante, tal como GUS. Una vez que se obtuvieron las plantas transgénicas, se pueden cultivar para producir tejidos vegetales o partes de plantas con el fenotipo deseado. Se puede cosechar el tejido vegetal o las partes de plantas y/o se pueden recolectar las semillas. La semilla puede servir como una fuente para cultivar plantas adicionales con tejidos o partes que tienen las características deseadas.

Una planta transgénica formada usando métodos de transformación con *Agrobacterium* u otros métodos contiene normalmente un solo locus genético sobre un cromosoma. Dichas plantas transgénicas pueden considerarse como hemigóticas para el o los genes agregados. Más preferida es una planta transgénica que es homocigota para el o los genes agregados; es decir, una planta transgénica que contiene dos genes agregados, un gen en el mismo locus de cada cromosoma de un par de cromosomas. Se puede obtener una planta transgénica homocigota por autofertilización de una planta transgénica hemigótica, germinación de algunas de las semillas producidas y análisis de las plantas resultantes para el gen de interés.

Se comprenderá asimismo que también se pueden cruzar (aparear) dos diferentes plantas transgénicas que contienen dos genes o loci exógenos que segregan de forma independiente para producir una descendencia que contiene a ambos juegos de genes o loci. El autocruzamiento de la progenie F1 apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos loci o genes exógenos agregados. También se contempla el retrocruzamiento con una planta progenitora y el exocruzamiento con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Se pueden consultar descripciones de otros métodos de cruzamiento usados comúnmente para distintos caracteres y cultivos en Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., American Society of Agronomy, Madison, Wis.

#### Animales transgénicos no humanos

Un "animal transgénico no humano" se refiere a un animal, distinto de un ser humano, que contiene una construcción genética ("transgén") que no está presente en un animal de tipo salvaje de la misma especie o raza. Un "transgén" al que se hace referencia en la presente tiene el significado normal en el arte de la biotecnología e incluye una secuencia genética que fue producida o alterada mediante tecnología de ADN o ARN recombinante y que fue introducida en una célula animal. El transgén puede incluir secuencias genéticas derivadas de una célula animal, que puede ser de la misma especie o raza, o de una especie o raza diferente, que la célula en la cual se introdujo el

transgén. Normalmente, el transgén fue introducido en el animal mediante manipulación humana tal como, por ejemplo por transformación, pero se puede usar cualquier método reconocido por los especialistas en el arte.

Las técnicas para producir animales transgénicos son bien conocidas en el arte. Un libro de texto general que es de utilidad sobre este tema es Houdebine, *Transgenic animals – Generation and Use* (Harwood Academic, 1997). La transformación de una molécula de polinucleótidos en una célula se puede efectuar mediante cualquier método por el cual se pueda insertar una molécula de polinucleótidos en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero en un sentido no limitativo, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión celular. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o se puede cultivar en un tejido, órgano o en un organismo multicelular. Las moléculas de polinucleótidos transformadas pueden permanecer en posición extracromosómica o se pueden integrar en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de manera tal que se retiene su capacidad para expresarse. Se puede introducir ADN heterólogo, por ejemplo, en huevos de mamífero fertilizados. Por ejemplo, se pueden transformar células de tallos totipotenciales o pluripotenciales por microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, infección retroviral u otros medios, luego las células transformadas se introducen en el embrión y a continuación el embrión se desarrolla en un animal transgénico. En un método muy preferido, los embriones en desarrollo se infectan con un retrovirus que contiene al ADN deseado y se producen animales transgénicos a partir del embrión infectado. Sin embargo, en un método más preferido los ADN apropiados se coinyectan en el pronúcleo o citoplasma de los embriones, preferentemente en la etapa de una sola célula y se deja que los embriones se desarrollen en animales transgénicos maduros.

Otro método usado para producir un animal transgénico comprende microinyectar un ácido nucleico en huevos en etapa pro-nuclear mediante métodos estándar. Los huevos inyectados se cultivan luego antes de su transferencia en los oviductos de individuos receptores pseudopreñados.

Los animales transgénicos también se pueden producir mediante tecnología de transferencia nuclear. Con el uso de este método, se transfectan de forma estable fibroblastos de animales donantes con un plásmido incorporando las secuencias codificantes para un dominio de unión o un miembro de unión de interés bajo el control de secuencias reguladoras. Los transfectantes estables se fusionan luego con oocitos enucleados, se cultivan y se transfieren a receptores femeninos.

#### Aumento de los niveles de ARN exógeno y expresión estabilizada

##### *Supresores por silenciamiento*

El silenciamiento de genes posterior a la transcripción (PTGS) es un mecanismo de defensa específico de secuencias de nucleótidos que puede estar dirigido al ARNm celular y vírico para su degradación. El PTGS tiene lugar en plantas u hongos transformados de forma estable o transitorio con un ADN extraño (heterólogo) o endógeno y da como resultado una acumulación reducida de moléculas de ARN con similitud de secuencia con el ácido nucleico introducido.

Se ha considerado en general que la coexpresión de un supresor por silenciamiento con un transgén de interés incrementará los niveles de ARN presentes en la célula transcritos a partir del transgén. Si bien se ha demostrado que esto es así para células *in vitro*, se han observado efectos secundarios significativos en muchos estudios de coexpresión en plantas completas. Más específicamente, como se describe en Mallory et al., (2002), Chapman et al., (2004); Chen et al., (2004), Dunoyer et al., (2004), Zhang et al., (2006), Lewsey et al., (2007) y Meng et al., (2008), las plantas que expresan supresores por silenciamiento, en general bajo promotores constitutivos, a menudo son fenotípicamente anormales hasta el grado que no son de utilidad para la producción comercial.

Según se ha indicado previamente, los inventores de la presente invención han encontrado que se pueden incrementar los niveles de moléculas de ARN y/o se pueden estabilizar los niveles de moléculas de ARN sobre numerosas generaciones limitando la expresión del supresor por silenciamiento a un órgano de almacenamiento de una planta o a una parte del mismo. Como se usa en el presente documento, un "supresor por silenciamiento" es cualquier polinucleótido o polipéptido que se puede expresar en una célula vegetal que aumente el nivel de los productos de expresión de un transgén diferente en la célula vegetal, en particular sobre repetidas generaciones a partir de la planta inicialmente transformada. En un aspecto, el supresor por silenciamiento es un supresor por silenciamiento vírico o un mutante del mismo. Se conocen numerosos supresores por silenciamiento vírico en el arte que incluyen, pero en un sentido no limitativo, P19, V2, P38, Pe-Po y RPV-P0. En un aspecto, el supresor por silenciamiento vírico comprende aminoácidos cuya secuencia se provee en cualquiera de las SEQ ID NO: 97 a 101, un fragmento biológicamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a cualquiera entre una o más de las SEQ ID NO: 97 a 101 y que tiene actividad como un supresor por silenciamiento.

Como se usa en el presente documento, los términos "expresión estabilizadora", "expresado de forma estable", "expresión estabilizada" y variaciones de los mismos, se refieren a que el nivel de la molécula de ARN es esencialmente el mismo o mayor en las plantas de progenie sobre repetidas generaciones, por ejemplo al menos

tres, al menos cinco o al menos 10 generaciones, en comparación con las plantas isogénicas que no contienen al polinucleótido exógeno que codifica al supresor por silenciamiento. Sin embargo, estos términos no excluyen la posibilidad que sobre repetidas generaciones hay una cierta pérdida de los niveles de la molécula de ARN en comparación con una generación anterior, por ejemplo no menos que un 10 % de pérdida por generación.

5 El supresor se puede seleccionar de cualquier fuente como por ejemplo vegetal, vírico, de mamífero, etc. El supresor puede ser, por ejemplo:

- 10 • virus B2 de los gallineros;
- virus P14 latente de *Pothos*;
- virus AC2 latente de *Pothos*;
- virus en mosaico AC4 de mandioca africana;
- enfermedad por el virus en mosaico de amarilleamiento de venas C2 de Bhendi;
- enfermedad por el virus en mosaico de amarilleamiento de venas C4 de Bhendi;
- 15 • enfermedad por el virus en mosaico de amarilleamiento de venas  $\beta$ C1 de Bhendi;
- virus de clorosis p22 de tomate;
- virus de clorosis CP de tomate;
- virus de clorosis CPm de tomate;
- virus en mosaico dorado AL2 de tomate;
- 20 • virus de hoja enrollada Java  $\beta$ C1 de tomate;
- virus de amarilleamiento de hojas enrolladas V2 de tomate;
- virus de amarilleamiento de hojas enrolladas China-C2 de tomate;
- forma aislada  $\beta$ C1 del virus Y10-China de amarilleamiento de hojas enrolladas de tomate;
- forma aislada V2 israelí de amarilleamiento de hojas enrolladas de tomate;
- 25 • virus en mosaico amarillo Vigna AC2 de habichuela;
- virus clorótico de manchas en anillo CP de hibisco;
- virus rugoso P38 de nabo;
- virus rugoso CP de nabo;
- virus en mosaico de la coliflor P6;
- 30 • virus de amarilleamiento p21 de remolacha;
- virus tristeza p20 de cítricos;
- virus tristeza p23 de cítricos;
- virus tristeza CP de cítricos;
- virus en mosaico SCP de caupí;
- 35 • virus enano clorótico p22 de batata;
- virus en mosaico 2b de pepino;
- virus HC-Pro de aspermia de tomate;
- virus L2 de punta enrollada de remolacha;
- virus en mosaico 19K del suelo de trigo;
- 40 • virus en mosaico estriado Gammab de cebada;
- virus Gammab semilatenente de *Poa*;
- pecluvirus P15 de aglomeraciones de maní;
- virus Pns10 enano de arroz;
- virus P0 de amarilleamiento transmitido por áfidos de cucurbitáceas;
- 45 • virus P0 de amarilleamiento del oeste de la remolacha;
- virus X P25 de patata;
- virus P1b del amarillamiento de venas de pepino;
- virus HC-Pro pox de ciruela;
- virus en mosaico HC-Pro de caña de azúcar
- 50 • virus Y cepa HC-Pro de patata;
- virus del grabado de la hoja P1/HC-Pro de tabaco;
- virus en mosaico P1/HC-Pro de nabo;
- virus P1 moteado de pasto ovillo;
- forma aislada del virus noruego P1 moteado de pasto ovillo;
- 55 • virus P1 moteado amarillo de arroz;
- forma aislada del virus nigeriano P1 moteado amarillo de arroz;
- virus NS3 de hoja blanca de arroz;
- virus NS3 estriado de arroz;
- virus en mosaico del tabaco 126K infectante de crucíferas;
- 60 • virus en mosaico del tabaco p122 infectante de crucíferas;
- virus en mosaico del tabaco p122;
- virus en mosaico del tabaco 126
- virus en mosaico del tabaco 130K;

- virus del cascabel 16K de tabaco;
- virus enano arbustivo P19 de tomate;
- virus bandeado reticular NSs de tomate;
- virus de manchas cloróticas de hojas P50 de manzana;
- 5 • virus A p10 de uva;
- virus 2 homólogo de BYV p21 asociado a enrollamiento de hojas de uva,

así como variantes/mutantes de los mismos. El listado anterior proporciona el virus del cual se puede obtener el supresor y la denominación de la proteína (por ejemplo, B2, P14 etc.) o región codificante del supresor de cada virus particular.

Se pueden usar múltiples copias de un supresor. Se pueden usar diferentes supresores juntos (por ejemplo, en tándem).

### 15 *Moléculas de ARN*

Se puede coexpresar esencialmente cualquier molécula de ARN que se deseara expresar en un órgano de almacenamiento de una planta con el supresor por silenciamiento. La molécula de ARN puede afectar una característica agronómica, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características de los granos y semejantes. Los polipéptidos codificados pueden estar relacionados con el metabolismo de aceite, almidón, carbohidratos, nutrientes, etc., o pueden ser responsables de la síntesis de proteínas, péptidos, ácidos grasos, lípidos, ceras, aceites, almidones, azúcares, carbohidratos, sabores, olores, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de almacenamiento, ácidos fenólicos, alcaloides, ligninas, taninos, celulosas, glicoproteínas, glucolípidos, etc.

En un ejemplo particular, las plantas producidas incrementaron los niveles de enzimas para la producción de aceite en plantas, tales como *Brassicas*, por ejemplo colza oleaginosa o girasol, alazor, lino, algodón, poroto de soja o maíz; enzimas relacionadas con la síntesis de almidón en plantas tales como patata, maíz y cereales tal como trigo, cebada o arroz; enzimas que sintetizan, o proteínas que ellas mismas son, medicamentos naturales, tales como productos farmacéuticos o veterinarios.

Los tipos de polipéptidos contemplados para la producción en un método de la presente invención incluyen proteínas farmacéuticas para su uso en mamíferos, incluyendo el hombre, tal como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como  $\alpha$ -interferón y  $\beta$ -interferón, factores de coagulación sanguínea tales como los Factores VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad tal como la hormona luteinizante, hormona folículo-estimulante, factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos, prolactina, oxitocina, hormona estimulante de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, hormona paratiroide, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como  $\beta$ -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, hormona de crecimiento, albúmina de suero humana, fosfatasa alcalina secretada humana, aprotinina,  $\alpha$ 1-antitripsina, IgG1 (fosfonato éster), IgM (hapteno neuropéptido), SIgA/G (adhesina de *Streptococcus mutans*), inmunotoxina scFv-briodina 1 (CD 40), IgG (HSV), LSC (HSV) y semejantes.

Además, el método de la invención se puede usar para la producción de anticuerpos específicos, incluyendo moléculas relacionadas con anticuerpos o fragmentos activos de los mismos que se unen, por ejemplo, al receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IB; EL6; STEAPI; MPF; Napi3b; Sema 5b; PSCA; receptor endotelina tipo B; MSG783; STEAP2; TrpM4; CRIPTO; CD21; CD79b; FcRH2; HER2; NCA; MDP; IL20R $\alpha$ ; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; receptor del factor activante de células B; CD22; CD79a; CXCR5; HLA-DOB; P2X5; CD72; LY64; FcRHL; IRTA2; TENB2; CD20; VEGF incluyendo VEGF\_A, B, C o D; p53; EGFR; receptor de progesterona; catepsina D; Bcl-2; E caderina; CEA; Lewis X; Ki67; PCNA; CD3; CD4; CD5; CD7; CD11c; CD11d; c-Myc; tau; PrPSC; o A $\beta$ .

Además, el método de la invención se puede usar en la producción de un antígeno, que puede ser distribuido, o no, al consumir el órgano de almacenamiento, ejemplos de los cuales incluyen la proteína de la envoltura del virus de Hepatitis B, la glicoproteína del virus de la rabia, la enterotoxina sensible al calor de *Escherichia coli*, la proteína de la cápside del virus Norwalk, un autoantígeno en diabetes, subunidad de toxina B de la cólera, subunidades B y A2 de la toxina de la cólera, enterotoxina de rotavirus y fusiones de antígenos de fimbrias enterotoxigénicas de *E. coli*, glicoproteína S del virus de gastroenteritis transmisible porcino, rinovirus 15 humano (HRV-14) y epítopes del virus de inmunodeficiencia humana de tipo (HIV-1), epítopes del virus de enteritis de visón, proteína estructural VP1 del virus de aftosa, glicoproteína B del citomegalovirus humano, antígenos de caries dentales (*S. mutans*) y antígenos del virus sincicial respiratorio.

### Niveles de LC-PUFA producidos

65 Los niveles de los LC-PUFA o la combinación de los LC-PUFA producidos en la célula recombinante son de

importancia. Los niveles se pueden expresar como una composición (porcentual) de los ácidos grasos totales de un LC-PUFA particular o de un grupo de LC-PUFA relacionados, por ejemplo el  $\omega$ 3 LC-PUFA o el  $\omega$ 6 LC-PUFA o el VLC-PUFA, u otra que se puede determinar mediante métodos conocidos en el arte. El nivel también se puede expresar como el contenido de LC-PUFA, tal como por ejemplo el porcentaje de LC-PUFA en el peso seco del material que comprende las células recombinantes, por ejemplo el porcentaje de peso seco de las semillas que corresponde a LC-PUFA. Se podrá apreciar que el LC-PUFA producido en una semilla oleaginosa puede ser considerablemente mayor en términos del contenido de LC-PUFA que en un vegetal o un grano que no fue cultivado para la producción de aceite, aunque ambos pueden tener composiciones similares LC-PUFA, y ambos se pueden usar como fuentes de LC-PUFA para el consumo de seres humanos o animales.

Los niveles de LC-PUFA se pueden determinar mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte. En un método preferido, se extraen los lípidos totales de las células, tejidos u organismos y el ácido graso es convertido en ésteres metílicos antes del análisis mediante cromatografía gaseosa (GC). Dichas técnicas se describen en el Ejemplo 1. Se puede usar la posición del pico en el cromatograma para identificar cada ácido graso particular, y se puede integrar el área bajo cada pico para determinar la cantidad. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el porcentaje de un ácido graso particular en una muestra se determina como el área bajo el pico para dicho ácido graso como un porcentaje del área total de los ácidos grasos en el cromatograma. Esto corresponde esencialmente a un porcentaje en peso (p/p). La identidad de los ácidos grasos se puede confirmar por GC-MS. Los lípidos totales se pueden separar mediante técnicas conocidas en el arte para purificar fracciones tales como la fracción TAG. Por ejemplo, se puede conducir una cromatografía en capa delgada (TLC) a escala analítica para separar la fracción TAG de las demás fracciones de lípidos tal como DAG, acil-CoA o fosfolípido con el fin de determinar la composición de ácidos grasos específica de TAG.

En una realización, la suma total de ARA, EPA, DPA y DHA en los ácidos grasos en la célula comprende al menos 15 %, más preferentemente al menos 20 % o al menos 25 % de los ácidos grasos totales en la célula. En un aspecto más preferida, la suma total de dichos ácidos grasos es de al menos 29 %, al menos 30 % o al menos 31 % de los ácidos grasos totales en la célula. En un aspecto adicional, los ácidos grasos totales en la célula comprenden menos que un 1 % de C20:1. En otro aspecto, la cantidad de DHA en los ácidos grasos en la célula es de al menos un 3 %, más preferentemente al menos un 4 %, más preferentemente al menos un 5 % o al menos un 7 %, o con mayor preferencia al menos un 10 %, de los ácidos grasos totales en la célula. En formas de realización preferidas, los TAG extraíbles en la célula comprende los ácidos grasos a los niveles a los que se hace referencia en este párrafo. También abarca cada combinación posible de estas características. Por ejemplo, la suma total de ARA, EPA, DPA y DHA en los ácidos grasos en la célula puede comprender al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 29 %, al menos 30 % o al menos 31 % de los ácidos grasos totales en la célula, de los cuales al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 7 % o al menos un 10 % de los ácidos grasos totales en la célula es DHA, en tanto el nivel de C20:1 puede ser menor que el 1 %.

En cada una de estas realizaciones, la célula recombinante puede ser una célula de un organismo adecuado para una fermentación tal como, por ejemplo, un microorganismo unicelular que puede ser un procarionta o un eucariota, tal como una levadura o una célula vegetal. En un aspecto preferido, la célula es una célula de una angiosperma (planta superior). En un aspecto preferido adicional, la célula es una célula de una semilla tal como, por ejemplo, una semilla oleaginosa o un grano o un cereal.

El nivel de producción de LC-PUFA en la célula recombinante también se puede expresar como una relación de conversión, es decir, la cantidad de LC-PUFA formada como un porcentaje de uno o más sustratos PUFA o LC-PUFA. Con respecto a EPA, por ejemplo, esto se puede expresar como la relación entre el nivel de EPA (como un porcentaje de los ácidos grasos totales) y el nivel de un sustrato de ácido graso (ALA, SDA, ETA o ETrA).

En una realización, la eficacia de la conversión de ALA en EPA es de al menos un 80 % o más preferentemente del 90 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de ALA en EPA, DPA o DHA (calculada como la suma de los porcentajes para EPA, DPA y DHA/ la suma de los porcentajes para ALA y todos los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 6-desaturados a partir de ALA) es de al menos un 17,3 % o de al menos un 23 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de ALA en DPA o DHA (calculada como la suma de los porcentajes para DPA y DHA/ la suma de los porcentajes para ALA y todos los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 6-desaturados a partir de ALA) es de al menos un 15,4 % o de al menos un 21 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de ALA en DHA (calculada como el porcentaje para DHA/ la suma de los porcentajes para ALA y todos los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 6-desaturados a partir de ALA) es de al menos un 9,5 % o de al menos un 10,8 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de EPA en DHA (calculada como el porcentaje para DHA/ la suma de los porcentajes para EPA y todos los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 5-elongados a partir de EPA) es de al menos un 45 % o de al menos un 50 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de SDA para producir ETA (calculada como la suma de los porcentajes para ETA y los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 5-desaturados a partir de ETA / la suma de los porcentajes para SDA y todos los productos de ácidos grasos  $\Delta$ 6-elongados a partir de SDA) es de al menos un 50 %, más preferentemente de al menos un 60 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de ALA en ETrA es de al menos un 6 %, más preferentemente de al menos un 9 %. En otra realización, la eficacia de la conversión de EPA en DPA (calculada como la suma de los porcentajes para DPA y DHA/ la suma de los porcentajes para EPA, DPA y DHA) a través de

un paso con una  $\Delta 5$  elongasa es de al menos un 60 %, más preferentemente de al menos un 65 %, más preferentemente de al menos un 70 % o con mayor preferencia de al menos un 75 %.

El contenido de LC-PUFA en la célula recombinante se puede maximizar si la célula progenitora usada para la introducción de los genes es elegida de modo tal que el nivel de sustrato de ácido graso producido o provisto exógenamente es óptimo. El nivel de LC-PUFA también se puede maximizar cultivando o incubando las células bajo condiciones óptimas, por ejemplo a una temperatura ligeramente menor que la temperatura estándar para dicha célula, lo cual se cree favorece la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados. En particular, sin embargo, la evidencia existente hasta la fecha sugiere que algunas desaturasas expresadas heterológicamente en levadura o plantas tienen una actividad relativamente baja en combinación con algunas elongasas. Esto se puede aliviar proporcionando una desaturasa con la capacidad de usar una forma acil-CoA del ácido graso como un sustrato en la síntesis de LC-PUFA, y se cree que esto es ventajoso en células recombinantes distintas de levadura, tales como células vegetales.

#### 15 Producción de aceites

Se pueden emplear las técnicas que son de práctica rutinaria en el arte para extraer, procesar y analizar los aceites producidos por células, plantas, semillas, etc. de la presente invención. Normalmente, las semillas de las plantas se cocinan, se prensan y se extraen para producir un aceite crudo, que luego es desgomado, refinado, blanqueado y desodorizado. En general, las técnicas para triturar semillas son conocidas en el arte. Por ejemplo, las semillas oleaginosas se pueden temperar rociándolas con agua para elevar el contenido de humedad, por ejemplo, a un 8,5 %, y cortar en copos usando un rodillo compactador liso con un ajuste de hueco definido en 0,23 a 0,27 mm. Según el tipo de semilla, se puede agregar agua, o no, antes de la trituración. La aplicación de calor desactiva las enzimas, facilita la ruptura celular posterior, coalesce las gotas de aceite y aglomera las partículas de proteínas, todo lo cual facilita el proceso de extracción.

La mayoría de los aceites de semillas se libera por medio de pasaje a través de una prensa de tornillo. Las tortas expulsadas de la prensa de tornillo son sometidas a extracción con solvente, por ejemplo, con hexano, usando una columna de temperatura controlada. Como alternativa, el aceite crudo producido por la operación de prensado se puede hacer pasar a través de un tanque de asentamiento con una vía de drenaje acanalada superior para remover los sólidos que se generan con el aceite durante la operación de prensado. El aceite clarificado se puede hacer pasar a través de un filtro tipo placa y marco para remover cualquier partícula sólida fina. Si se deseara, el aceite recuperado del proceso de extracción se puede combinar con el aceite clarificado para producir un aceite crudo mezclado.

Una vez que se deprivó el solvente del aceite crudo, se combinan las porciones prensadas y extraídas y luego son sometidas a los procedimientos normales de procesamiento de aceite (es decir, desgomado, refinación cáustica, blanqueado y desodorización). El desgomado se puede realizar por adición de ácido fosfórico concentrado al aceite crudo para convertir los fosfátidos no hidratables en una forma hidratable y para quelar los metales menores que están presentes en el aceite. La goma se separa del aceite por centrifugación. El aceite se puede refinar por adición de una cantidad suficiente de una solución de hidróxido de sodio para titular todos los ácidos grasos y remover los jabones así formados.

La desodorización se puede realizar calentando el aceite a 260 °C bajo vacío e introduciendo lentamente vapor en el aceite a una velocidad de 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite aproximadamente. Después de aproximadamente 30 minutos de burbujeo, se deja que el aceite se enfríe bajo vacío. El aceite es transferido normalmente a un recipiente de vidrio y se lava con argón antes de almacenarlo bajo refrigeración. Si la cantidad de aceite es limitada, el aceite se puede colocar bajo vacío, por ejemplo, en un reactor Parr y calentar a 260 °C por el mismo tiempo que hubiera sido desodorizado. Este tratamiento mejora el color del aceite y remueve la mayoría de las sustancias volátiles.

#### 50 Alimentos

La presente invención incluye composiciones que se pueden usar como alimentos. A los efectos de la presente invención, el término "alimentos" incluye cualquier alimento o preparación destinada al consumo de seres humanos o animales (incluyendo un consumo por vía enteral y/o parenteral) que cuando es ingerido por el cuerpo (a) sirve para nutrir o aumentar los tejidos o suministrar energía; y/o (b) mantiene, restablece o sustenta un estado nutricional o función metabólica adecuados. Los alimentos de la invención incluyen composiciones nutricionales para bebés y/o niños.

Los alimentos que se describen en el presente documento comprenden, por ejemplo, una célula de la invención, una planta de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, un extracto de la invención, el producto del método de la invención, el producto del proceso de fermentación de la invención o una composición junto con uno o más vehículos adecuados. El término "vehículo" se usa en su sentido más amplio para abarcar cualquier componente que puede tener, o no, valor nutricional. Como podrá apreciar el especialista, el vehículo debe ser adecuado para su uso (o usado a una concentración suficientemente baja) en un alimento de modo tal que no tenga efectos nocivos sobre un organismo que consume el alimento.

El alimento que se describe en el presente documento comprende un aceite, un éster de ácido graso o un ácido graso producido directa o indirectamente mediante el uso de los métodos, células o plantas divulgados en la presente. La composición se puede encontrar en la forma de un gel o de un líquido. Además, la composición puede incluir macronutrientes comestibles, vitaminas y/o minerales en las cantidades deseadas para un uso particular. Las cantidades de estos ingredientes varían dependiendo de si la composición se usará con individuos normales o si se usará con individuos que tienen necesidades especiales, tales como los individuos que sufren de trastornos metabólicos y semejantes.

Los ejemplos de vehículos adecuados con valor nutricional incluyen, pero en un sentido no limitativo, macronutrientes tales como grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Los ejemplos de tales grasas comestibles incluyen, pero en un sentido no limitativo, aceite de coco, aceite de borraja, aceite de hongos, aceite de grosellas, aceite de soja y mono y diglicéridos. Los ejemplos de dichos carbohidratos incluyen (pero en un sentido no limitativo): glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado. Además, los ejemplos de proteínas que se pueden utilizar en la composición nutricional de la invención incluyen (pero en un sentido no limitativo) proteínas de soja, suero electrodiализado, leche descremada electrodiализada, suero de leche o los hidrolizados de estas proteínas.

Con respecto a las vitaminas y los minerales, se puede agregar lo siguiente a las composiciones de alimento de la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo y las vitaminas A, E, D, C y el complejo B. También se pueden agregar otras vitaminas y minerales.

Los componentes utilizados en las composiciones alimenticias de la presente invención pueden ser de origen semipurificado o purificado. Los términos semipurificado o purificado se refieren a un material que fue preparado por purificación de un material natural o mediante síntesis *de novo*.

La composición alimenticia de la presente invención también se puede agregar a un alimento aun cuando la dieta no requiera de suplementos. Por ejemplo, la composición se puede agregar a un alimento de cualquier tipo, incluyendo (pero en un sentido no limitativo): margarina, manteca modificada, quesos, leche, yogur, chocolate, caramelos, refrigerios, aceites para ensalada, aceites para cocinar, grasas para cocinar, carnes, pescado y bebidas.

El género *Saccharomyces* spp se usa tanto en la elaboración de cerveza como en la elaboración de vino y también como agente de horneado, en particular de pan. La levadura es uno de los constituyentes principales de los extractos vegetales. La levadura también se usa como un aditivo en los piensos. Resultará evidente que se pueden suministrar cepas de levadura manipuladas genéticamente que están adaptadas para sintetizar los LC-PUFA que se describen en la presente. Estas cepas de levadura se pueden usar luego en alimentos y en la elaboración de vino y cerveza para proporcionar productos con un mayor contenido de ácidos grasos.

Además, los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención o células hospedadoras transformadas para contener y expresar los genes objeto de la presente también se pueden usar como suplementos de piensos para alterar el tejido de un animal o la composición de ácidos grasos de la leche para uno que fuera más deseable para consumo humano o animal. Los ejemplos de dichos animales incluyen ovejas, ganado, caballos y semejantes.

Además, los alimentos de la invención se pueden usar en acuicultura para incrementar los niveles de ácidos grasos en los peces para consumo humano o de animales.

Los alimentos preferidos de la invención son las plantas, semillas y otras partes de plantas tales como hojas y tallos que se pueden usar directamente como alimento o pienso para seres humanos u otros animales. Por ejemplo, los animales pueden pastar directamente sobre tales plantas cultivadas a campo o pueden ser alimentados con cantidades más medidas en una alimentación controlada. La invención incluye el uso de dichas plantas y partes de plantas como un alimento para incrementar los niveles de LC-PUFA en seres humanos y otros animales.

### Composiciones

La presente memoria descriptiva también abarca composiciones, en particular composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los ácidos grasos y/o los aceites resultantes producidos con los métodos de la invención.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más de los ácidos grasos y/o aceites, en combinación con un transportador, adyuvante o vehículo estándar, bien conocido, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como solución amortiguadora fosfato salina, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión tal como una emulsión de agua/aceite. La composición se puede encontrar en una forma líquida o sólida. Por ejemplo, la composición se puede encontrar en la forma de una tableta, cápsula, líquido o polvo ingerible, inyectable o como un ungüento o crema tópica. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, manteniendo el tamaño de requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de agentes tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y semejantes. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, como por ejemplo agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saborizantes y agentes perfumantes.

Las suspensiones pueden comprender, además del ingrediente activo, agentes de suspensión, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de estas sustancias.

Las formas de dosificación sólidas, tales como tabletas y cápsulas, se pueden preparar usando técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo, los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención se pueden conformar como tabletas con las bases para tabletas convencionales, tal como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes desintegrantes tal como almidón de patata o ácido algínico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas se pueden preparar incorporando estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y el o los ácidos grasos relevantes.

Para una administración intravenosa, los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención, o derivados de los mismos, se pueden incorporar en formulaciones comerciales.

Una dosificación típica de un ácido graso particular comprende entre 0,1 mg y 20 g, ingeridas una a cinco veces por día (hasta 100 g por día) y preferentemente se encuentra en el rango de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1, 2, 5 o 10 g diarios (tomado en una o múltiples dosis). Según es de conocimiento en el arte, resulta deseable un mínimo de aproximadamente 300 mg/día de ácidos grasos, en especial de LC-PUFA. Sin embargo, se podrá apreciar que cualquier cantidad de ácidos grasos será beneficiosa para el sujeto.

Las posibles rutas de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, la vía enteral (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida se puede administrar por vía oral o rectal. Además, se puede dispersar por completo una mezcla homogénea en agua, mezclar bajo condiciones estériles con diluyentes, conservantes, soluciones amortiguadoras o propelentes fisiológicamente aceptables para formar un aerosol o inhalante.

La dosificación de la composición que será administrada al paciente puede ser determinada por el especialista en el arte y depende de diversos factores tales como peso del paciente, edad del paciente, estado de salud general del paciente, antecedentes del paciente, estado inmune del paciente, etc.

Además, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar con fines de cosméticos. Se pueden agregar a composiciones cosméticas pre-existentes de modo tal que se forma una mezcla o se puede usar un ácido graso producido de acuerdo con la presente invención como único ingrediente "activo" en una composición cosmética.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Materiales y métodos

#### Cultivo de microalgas

Se cultivaron aislados de *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140 de la colección de microalgas vivas CSIRO (<http://www.marine.csiro.au/microalgae>) bajo condiciones estándares de cultivo. Un cultivo madre de la colección se subcultivó y se escaló en una dilución de 1 en 10 en transferencias consecutivas en frascos Erlenmeyer de 1 l y luego en botellones de policarbonato de 10 l. El medio de cultivo fue f/2, una modificación del medio f de Guillard y Ryther (1962) conteniendo nutrientes de mitad de concentración, con una temperatura de crecimiento de 20±1°C. Otras condiciones de cultivo incluyeron una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol.fotones PAR.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12:12 horas de luz:oscuridad, y burbujeo con 1 % CO<sub>2</sub> en aire con un flujo de 200  $\text{ml.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### Aislamiento de ADN genómico de microalgas

Se aisló el ADN genómico de *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140 usando el sistema DNeasy Plant Mini Kit como se describía en el manual de instrucciones adjunto (QIAGEN, número de catálogo 69106).

#### Aislamiento de ARN total de microalgas

Se aisló el ARN total de células *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140 usando el siguiente método. Se pulverizaron 2 g (peso húmedo) de células usando un mortero y pilón en nitrógeno líquido y se esparció lentamente en un vaso de precipitados conteniendo 22 ml de solución amortiguadora de extracción con agitación continua. Para esto, se agregó polivinilpirrolidona insoluble 5 %, 2-mercaptoetanol 90 mM, y ditiotreitól 10 mM y la mezcla se agitó durante otros 10 minutos antes de ser transferida a un tubo Corex™. Se agregaron 18,4 ml de acetato de amonio 3 M y se mezcló bien. La mezcla luego se centrifugó a 6000  $\times\text{g}$  durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se precipitaron los ácidos nucleicos por la adición de 0,1 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 0,5 volúmenes de isopropanol frío. Luego de 1 hora de incubación a -20°C, la muestra se centrifugó a 6000  $\times\text{g}$  durante 30 minutos en un rotor basculante. El aglomerado se resuspendió en 1 ml de agua y se extrajo con

fenol/cloroformo. La capa acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se precipitaron una vez más los ácidos nucleicos por la adición de 0,1 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol frío. El aglomerado se resuspendió en agua y se determinó la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría.

## 5 Vectores y cepas

El plásmido pYES2 y la cepa de levadura INVSC1 se obtuvieron de Invitrogen, el vector plasmídico pGEMT-Easy de Promega, vector plasmídico pBluescript II KS- de Stratagene. La cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* fue en referencia a Lazo *et al.* (1991) y las series de vectores binarios pORE a Coutu *et al.* (2007).

10

## Condiciones de PCR

Para amplificar los fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usaron condiciones estándares a menos que se especifique de otro modo. La optimización de las condiciones se realizó por variación en el número de ciclos de amplificación, la temperatura para el apareamiento de los cebadores, concentración de Mg<sup>2+</sup> y otros parámetros tal como se hace generalmente en el arte. Las soluciones amortiguadoras fueron como las especificaban los proveedores de las polimerasas. Generalmente, las condiciones de reacción fueron como sigue. Luego de una desnaturalización inicial a 94°C durante entre 2 y 3 minutos, las mezclas de reacción se trataron durante entre 20 y 40 ciclos de desnaturalización/apareamiento/extensión con desnaturalización a 94°C durante entre 30 y 60 segundos, apareamiento de los cebadores a entre 40 y 60°C durante 30 segundos, y extensión de la polimerasa durante entre 30 y 60 segundos a entre 70 y 72°C, seguido de un paso de extensión adicional durante 3 minutos a entre 70 y 72°C.

La amplificación por PCR con transcripción reversa (RT-PCR) generalmente se realizó usando el sistema de RT-PCR Superscript III One-Step (Invitrogen) en un volumen de 25 µl usando 10 pmol del cebador directo y 30 pmol del cebador reverso, MgSO<sub>4</sub> en una concentración final de 2,5 mM, 400 ng de ARN total con solución amortiguadora y componentes de nucleótidos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los regímenes de temperatura típicos fueron: 1 ciclo de 45°C durante 30 minutos para que ocurra la transcripción reversa; luego 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 70°C durante 1 minuto; luego 1 ciclo de 72°C durante 2 minutos antes de enfriar la mezcla de reacción a 5°C.

## 5' y 3'-RACE

Para obtener los ADNc de longitud completa correspondientes a los fragmentos de genes de longitud parcial, se obtuvieron los extremos 5' y/o 3' de ADNc por los métodos 5'- y 3'-RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc). El extremo 3' de un ADNc se aisló usando un cebador directo específico de gen como se especifica en los ejemplos y un cebador reverso oligo-dT 5'-ATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:41), donde V representa tanto A, G o C, que fue común a todas las reacciones 3'-RACE. Se realizó una amplificación RT-PCR usando el sistema de RT-PCR Superscript III One-Step (Invitrogen) en un volumen de 25 µl usando 10 pmol del cebador directo y 30 pmol del cebador reverso, MgSO<sub>4</sub> en una concentración final de 2,5 mM, 400 ng de ARN total como molde para la síntesis de ADNc, y solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como lo especificó el proveedor. Las condiciones de ciclado fueron generalmente: 1 ciclo de 45°C durante 30 minutos para la transcripción reversa; luego 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos; seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 70°C durante 1 minuto y 1 ciclo de 72°C durante 2 minutos antes de enfriar a 5°C. Los amplicones generados en la reacción se ligaron en pGEM-T Easy, se clonaron en *E. coli* y se secuenciaron por métodos estándares.

A menos que se especifique de otro modo, el extremo 5' del ADNc se aisló usando un método de transferasa terminal modificado con 2 µg de ARN total como molde para la síntesis de ADNc. Se agregaron 10 pmol de un cebador reverso específico de gen al ARN total y 10,8 µl de agua antes de calentar la mezcla a 65°C durante 5 minutos y enfriar sobre hielo durante 2 minutos. Luego se agregaron los siguientes componentes: 4 µl de solución amortiguadora Superscript III first-strand cDNA (Invitrogen), 1 µl de 0,1 M de ditiotretitol, 1 µl de RNaseOUT (Invitrogen) y 1 µl de transcriptasa reversa Superscript III. La mezcla luego se incubó a 55°C durante 60 minutos y la reacción terminó por una incubación adicional a 70°C durante 15 minutos. Luego de enfriarla brevemente sobre hielo, la reacción se trató entonces con 2 unidades de RNasa H a 37°C durante 20 minutos. El ADNc luego se purificó usando el conjunto de elementos QIAQUICK PCR Purification (QIAGEN, número de catálogo 28106). Luego se colocó una cola de A a 25 µl del eluato usando 10 unidades de TdT (NEB), 5 µl de solución amortiguadora NEB #4, 5 µl de 2,5 mM de CoCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de 10 mM de dATP en un total de 50 µl. La reacción se realizó a 37°C durante 30 minutos seguido por la inactivación de la enzima a 70°C durante 10 minutos. Luego se llevó a cabo una reacción de PCR usando 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (NEB) en la mezcla de reacción incluyendo 5 µl del ADN con cola de A, 10 pmol cebador reverso específico de gen, 30 pmol del cebador oligo-dT modificado 5'-ATTTAGGTGACACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:41), donde V representa tanto A, G o C, y solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como se especifica en el manual adjunto. Las condiciones de ciclado generalmente fueron: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos; 5 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 54°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto; 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos; mantenido a 4°C. Cuando no se hizo visible una clara banda de

65

producto en el rango de tamaño esperado luego de una electroforesis en gel, la región del gel se cortó y quitó y se purificaron los productos de ADN del gel. Se usó una muestra de 1 µl de una dilución 1:20 del eluato como molde en una segunda ronda de PCR. Los amplicones generados en la reacción se ligaron en pGEM-T Easy y se secuenciaron.

5

#### Cultivo de levaduras y alimentación con ácidos grasos precursores

Se introdujeron plásmidos en levaduras por tratamiento térmico y los transformantes se seleccionaron en placas con medio mínimo para levaduras (YMM) conteniendo 2 % de rafinosa como la única fuente de carbono. Se establecieron cultivos de inóculo clonales en YMM líquido con 2 % de rafinosa como la única fuente de carbono. A partir de estos se inocularon cultivos experimentales en YMM + NP-40 1 %, hasta una OD600 inicial de aproximadamente 0,3. Los cultivos se hicieron crecer a 30°C con agitación (aproximadamente 60 rpm) hasta que la OD600 fue aproximadamente 1,0. En este punto se agregó galactosa hasta una concentración final de 2 % y se agregaron ácidos grasos precursores hasta una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se incubaron a 20°C con agitación durante otras 48 horas antes de colectarlos por centrifugación. Los aglomerados celulares se lavaron con NP-40 1 %, NP-40 0,5 % y agua para eliminar cualquier ácido graso no incorporado de la superficie de las células.

10

15

#### Expresión de genes en células vegetales en un sistema de expresión transitorio

Los genes se expresaron en células vegetales en un sistema de expresión transitorio esencialmente como lo describe Voinnet *et al.* (2003). Los plásmidos conteniendo la región codificante a ser expresada a partir de un promotor constitutivo fuerte tal como el promotor de 35S, se introdujeron en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Por separado, se introdujo un gen quimérico 35S:p19 en AGL1 para la expresión del supresor vírico por silenciamiento p19. Las células recombinantes se hicieron crecer a 28°C en caldo de cultivo suplementado con 50 mg/ml de kanamicina y 50 mg/ml de rifampicina hasta fase estacionaria. Las bacterias se aglomeraron por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser resuspendidas a OD600 = 1,0 en una solución amortiguadora de infiltración conteniendo MES 10 mM pH 5,7, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y acetosiringona 100 µM. Las células luego se incubaron a 28°C con agitación durante 3 horas antes de mezclar iguales volúmenes de cultivos de *Agrobacterium* conteniendo 35S:p19 y el o los genes quiméricos de ensayo de interés previo a la infiltración en el tejido de la hoja. Las plantas generalmente se hicieron crecer durante otros cinco días luego de la infiltración antes de que se tomaran discos de las hojas para el análisis de los ácidos grasos por GC.

20

25

30

Cuando el tejido de la hoja fue alimentado con ácidos grasos exógenos, los ácidos grasos se prepararon por calentamiento del ácido graso apropiado en solución de hidróxido de amonio 2M durante 20 minutos a 60°C luego de los cuales la solución se evaporó, también a 60°C. La sal resultante luego se resuspendió en solución amortiguadora de fosfato 0,1M (pH 7,2) hasta una concentración final de 0,5 µg/ml. La sal de ácido graso se inyectó en las hojas cuatro días luego de la infiltración de *Agrobacterium* y se tomaron discos de hojas a diferentes puntos en el tiempo luego de la alimentación, por ejemplo entre 2 y 48 horas luego de la adición del ácido graso exógeno, para el análisis de la composición de ácido graso. Los controles se incluyeron cuando se omitió el ácido graso exógeno, o cuando la cepa de *Agrobacterium* usada para la infiltración no contenía el gen de interés.

35

40

#### Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (GC)

##### Preparación de ácidos grasos

Cuando una muestra contenía una gran cantidad de agua, que incluye todas las muestras de hojas de *Nicotiana benthamiana* y otros tejidos no semilla, los lípidos totales se extrajeron usando el método descrito por Bligh y Dyer (1959) antes de la metilación. Los ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) se formaron por transesterificación del aglomerado de levaduras centrifugadas, semillas de *Arabidopsis*, lípidos totales de *Nicotiana benthamiana* u otras muestras de lípidos totales por calentamiento con MeOH-CHCl<sub>3</sub>-HCl (10:1:1, v/v/v) a entre 90 y 100°C durante 2 horas en un tubo de ensayo de vidrio ajustado con una tapa a rosca revestida con teflón. Los FAME se extrajeron en hexano-diclorometano (4:1, v/v) y se analizaron por GC y GC-MS.

45

50

##### Cromatografía capilar gaseosa-líquida (GC)

Los FAME se analizaron por cromatografía gaseosa (GC) usando un GC Agilent Technologies 6890N (Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con una columna capilar de sílice fusionada Equity™-1 (15 m x 0,1 mm de diámetro interno, 0,1 µm de espesor de película), un FID, un inyector con opción ranura/sin ranura y un automuestreador e inyector Agilent Technologies 7683 Series. Como gas vehículo se usó helio. Las muestras se inyectaron en el modo sin ranura a una temperatura de horno de 120°C. Luego de la inyección, la temperatura de horno se aumentó hasta 270°C a 10°C.min<sup>-1</sup> y finalmente a 310°C a 5°C.min<sup>-1</sup>. Los picos se cuantificaron con el programa de computación Agilent Technologies ChemStation (Rev B.03.01 (317), \ Palo Alto, California, EE.UU.).

55

60

##### Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS)

La GC-MS se llevó a cabo en un GC-MS Finnigan GCQ Plus de trampa de iones configurado con una inyección en

65

columna ajustada a 4°C. Las muestras se inyectaron usando un automuestreador AS2000 sobre una rendija de retención unida a una columna de fase unida HP-5 Ultra 2 (50 m x 0,32 mm de diámetro interno x 0,17 µm de espesor de película). La temperatura inicial de 45°C se mantuvo durante 1 minuto, seguido por una programación de temperatura a 30°C.min<sup>-1</sup> hasta 140°C luego a 3°C.min<sup>-1</sup> hasta 310°C donde se mantuvo durante 12 minutos. Como gas vehículo se usó helio. Las condiciones de operación de espectrometría de masa fueron: energía de impacto de electrones 70 eV; corriente de emisión 250 µamp, línea de transferencia 310°C; temperatura de fuente 240°C; velocidad de barrido 0,8 barridos.s<sup>-1</sup> y rango de masa entre 40 y 650 Dalton. El espectro de masa se adquirió y procesó con el programa de computación Xcalibur™.

#### 10 *Cultivo de levaduras y alimentación con ácidos grasos precursores*

Se introdujeron plásmidos en levaduras por tratamiento térmico y los transformantes se seleccionaron en placas con medio mínimo para levaduras (YMM) conteniendo 2 % de rafinosa como la única fuente de carbono. Se establecieron cultivos de inóculo clonales en YMM líquido con 2 % de rafinosa como la única fuente de carbono. A partir de estos se inocularon cultivos experimentales en YMM + NP-40 1 %, hasta una OD600 inicial de aproximadamente 0,3. Los cultivos se hicieron crecer a 30°C con agitación (aproximadamente 60 rpm) hasta que la OD600 fue aproximadamente 1,0. En este punto se agregó galactosa hasta una concentración final de 2 % y se agregaron ácidos grasos precursores hasta una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se incubaron a 20°C con agitación durante otras 48 horas antes de colectarlos por centrifugación. Los aglomerados celulares se lavaron con NP-40 1 %, NP-40 0,5 % y agua para eliminar cualquier ácido graso no incorporado de la superficie de las células.

#### **Ejemplo 2. Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica Δ6-elongasa de microalgas**

##### Aislamiento de un fragmento del gen de Δ6-elongasa de *Micromonas* CS-0170

25 La cepa CS-0170 de *Micromonas* de la colección de microalgas vivas CSIRO (WO2005/103253) se identificó como una cepa de microalgas que tenía un nivel nativo elevado de Δ5- y Δ6-elongación (Tabla 4).

30 **Tabla 4.** Conversión de ácidos grasos en las cepas *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140 de la colección de microalgas vivas CSIRO.

Tipo	PRASINOPHYCEAE	PRASINOPHYCEAE
Especies	<i>Micromonas pusilla</i>	<i>Pyramimonas cordata</i>
Cepa	CS0170	CS0140
Fase	logarítmica	logarítmica
16:1 (n-7)	0,7	0,8
18:1 (n-9)	0,3	0,2
18:1 (n-7)	5,5	14,8
16:2 (n-7)	0,2	0,0
18:2 (n-6)	0,1	0,7
18:3 (n-6)	0,0	0,0
20:4 (n-6)	0,0	0,0
16:3 (n-3)	0,0	0,0
16:4 (n-3)	20,4	14,3
18:3 (n-3)	1,4	4,6
18:4 (n-3)	20,7	25,6
18:5 (n-3)	16,7	3,4
20:3 (n-3)	0,1	1,2
20:4 (n-3)	0,0	0,0
20:5 (n-3)	0,3	0,4
22:5 (n-3)	0,3	4,1
22:6 (n-3)	8,5	4,5

En un intento por identificar las secuencias conservadas, las secuencias de aminoácidos de la elongasa de los números de acceso al GenBank AAV67800, ABC18314, CAD58540, CAL55414, AAV67797, XP\_001416454, AAW70157, AAV67799, ABC18313, AAY15135 se alinearon usando el algoritmo ClustalW. Entre las numerosas regiones de homología de diferentes grados de identidad, se eligieron los bloques de secuencia de aminoácidos consenso KXXXXXDT (SEQ ID NO:31) y MYXYY (SEQ ID NO:32) (donde cada X es, en forma independiente, cualquier aminoácido), correspondiente a las posiciones de aminoácidos 144-151 y 204-208, respectivamente, de AAY15135. Los cebadores degenerados 5'-AAGWWCIKSGARYISYTCGACAC-3' (SEQ ID NO:42) y 5'-AIIMIRTARTASGTGTACAT-3' (SEQ ID NO:43) donde I = inosina, W = A o T, R = A o G, Y = C o T, K = G o T, M = A o C, S = C o G, se sintetizaron basándose en las secuencias de estos dos bloques. Se realizó una amplificación por RT-PCR usando el sistema de RT-PCR Superscript III One-Step (Invitrogen) en un volumen de 50 µl usando 20 pmol de cada cebador, MgSO<sub>4</sub> en una concentración final de 2,5 mM, 200 ng de ARN total de *Micromonas* CS-0170 con solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como se especificó. Las condiciones de ciclado fueron: 48°C iniciales durante 30 minutos para la transcripción reversa, luego 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, seguido de

5 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos; luego 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos y luego 72°C durante 2 minutos. Se generó un amplicón de 209 pb, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció.

#### 5 *Aislamiento de un ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 6$ -elongasa de Micromonas CS-0170*

Los cebadores se diseñaron para extender el fragmento de 209 bp por 5' y 3'-RACE. El extremo 3' del gen se aisló como se describió en el ejemplo 1 usando el cebador directo específico de gen 5'-GAACAACGACTGCATCGACGC-3' (SEQ ID NO:44) y 200 ng de ARN total de *Micromonas* CS-0170. Se generó un amplicón de 454 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló usando el conjunto de elementos GeneRacer (Invitrogen, número de catálogo L1500-01) con una incubación para la transcripción reversa a 55°C durante 1 hora para generar el ADNc adaptado en 5' como se describe en el manual adjunto. El cebador 5' GeneRacer 5'-CGACTGGAGCACCAGGACACTGA-3' (SEQ ID NO:45) y el cebador reverso específico de gen 5'-TTGCGCAGCACCATAAAGACGGT-3' (SEQ ID NO:46) se usaron en una amplificación por PCR usando la ADN polimerasa Pfu Ultra II Fusion en un volumen de 50  $\mu$ l usando 10 pmol de cada, 1  $\mu$ l del molde de ADNc GeneRacer con solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como lo especifica el fabricante (Stratagene, número de catálogo 600670). Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; luego 72°C durante 2 minutos antes de enfriar a 4°C. Este producto luego se diluyó 1:10 y se usó 1  $\mu$ l como molde en una segunda ronda de PCR usando el cebador interno 5' GeneRacer 5'-GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (SEQ ID NO:47) y el cebador reverso específico de gen 5'-TTGCGCAGCACCATAAAGACGGT-3' (SEQ ID NO:46) usando las mismas condiciones de PCR como se usó en la primera ronda de amplificación. Se generó un amplicón de 522 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció.

25 Las secuencias de nucleótidos de los tres amplicones se ensamblaron en una secuencia que se predijo que era la secuencia de longitud completa. La región codificante de longitud completa con una región corta de UTR 5' luego se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa CS-0170 de *Micromonas* usando el cebador directo 5'-CAGGCGACGCGGCCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO:48), cebador reverso 5'-TTATTAGTTACTTGGCCTTTACCTTC-3' (SEQ ID NO:49) y ADN polimerasa Pfu Ultra II Fusion (Stratagene). Se generó un amplicón de 860 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. La secuencia del marco de lectura abierto del gen se presenta como que tiene la secuencia SEQ ID NO:1.

35 La secuencia de aminoácidos de longitud completa codificada por el gen se presenta como SEQ ID NO:2. El análisis por BLAST de la secuencia de la proteína reveló que el ADNc aislado codificaba tanto para  $\Delta 5$ - o  $\Delta 6$ -elongasa. Estos dos tipos de elongasas son similares al nivel de aminoácidos y la actividad que codificaban fue incierta sólo a partir de la secuencia de aminoácidos. Cuando se usa como una secuencia de búsqueda para el banco de datos de secuencias de proteínas Genbank usando BLASTP, el máximo grado de identidad entre la elongasa de *Micromonas* CS-0170 y otras elongasas fue 65 % con número de acceso CAL55414 que es la secuencia para la elongasa 2 de ácidos grasos poliinsaturados de *Ostreococcus tauri*. El dominio de la familia GNS1/SUR4 conservado (dominio conservado pfam01151 en NCBI) se representa en esta secuencia en los aminoácidos entre 49 y 274, que generalmente indica que la proteína está involucrada en los sistemas de elongación de ácidos grasos de cadena larga.

45 En la Figura 3 se provee un árbol de relación de secuencias basado en el alineamiento múltiple de secuencias similares a la elongasa de *Micromonas* CS-0170, incluyendo aquellas usadas para diseñar los cebadores degenerados originales.

#### *Caracterización funcional de la $\Delta 6$ -elongasa de Micromonas CS-0170 en levaduras*

50 La región codificante de proteína entera de este clon, contenida en un fragmento *SalI/SphI* en pGEM-T Easy se insertó en pYES2 en los sitios *XhoI/SphI*, generando el vector pYES2+MicElo1 para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levaduras se transformaron con pYES2+MicElo1 y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras conteniendo pYES2+MicElo1 se hicieron crecer en cultivo y el promotor de GAL se indujo con galactosa para la expresión del gen MicElo1. Luego de la adición de ALA, SDA o EPA (0,5 mM) al medio de cultivo y 48 horas de cultivo adicional a 30°C, se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares totales. Cuando se agregó ALA al medio, la presencia de ETrA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,2 % de los ácidos grasos totales, representando una eficacia de conversión baja pero medible del 0,4 %. Similarmente, cuando se agregó SDA al medio, la presencia de ETA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,2 %, representando una eficacia de conversión del 0,4 %, indicando un bajo nivel de actividad  $\Delta 6$ -elongasa. Sin embargo, cuando se agregó EPA al medio, la presencia de DPA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes no se detectó, indicando una falta de actividad  $\Delta 5$ -elongasa en las células de levaduras (Tabla 5).

**Tabla 5.** Conversión de ácidos grasos en células de levaduras transformadas con las construcciones genéticas que expresan elongasas aisladas de *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140.

Clon	Precursor de ácido graso/ % de FA totales	Ácido graso formado/ % de FA totales	Tasa de conversión
pYES2+ Mic-Elo1	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 52,2 %	ETra, 20:3 $\omega$ 3 / 0,2 %	0,4 %
pYES2+ Mic-Elo1	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 54,3 %	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 0,2 %	0,4 %
pYES2+ Mic-Elo1	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 2,0 %	DPA, 22:5 $\omega$ 3 / 0 %	0 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 51,4 %	ETra, 20:3 $\omega$ 3 / 5,3 %	9,3 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 17,9 %	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 34,1 %	65,6 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 2,1 %	DPA, 22:5 $\omega$ 3 / trazas	-
pYES2+ Pyrco-Elo2	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 56,4 %	ETra, 20:3 $\omega$ 3 / 0,3 %	0,5 %
pYES2+ Pyrco-Elo2	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 51,7 %	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 0,7 %	1,3 %
pYES2+ Pyrco-Elo2	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 0,6 %	DPA, 22:5 $\omega$ 3 / 1,8 %	75,0 %

#### Aislamiento y caracterización de una $\Delta$ 6-elongasa de *Pyramimonas* CS-0140

5

##### Aislamiento de un fragmento del gen de $\Delta$ 6-elongasa *Pyramimonas* CS-0140

A partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los números de acceso al GenBank ABO94747, CAI58897, CAJ30869, CAL23339 y AAV67797, los inventores identificaron los bloques de secuencia de aminoácidos consenso KIYEFVDT (SEQ ID NO:33) y VHVCMYT (SEQ ID NO:34) correspondiente a las posiciones de aminoácidos 143-150 y 199-205, respectivamente, de AAV67797. Los cebadores degenerados 5'-AARATMTAYGAGTTYGTIGATAC-3' (SEQ ID NO:50) y 5'-TAIGTGTACATGCACACRTGWACCC-3' (SEQ ID NO:51) (abreviaturas como más arriba) se sintetizaron basándose en las secuencias de estos dos bloques. Se realizó una amplificación por RT-PCR usando el sistema de RT-PCR Superscript III One-Step con 100 ng de ARN total de *Pyramimonas* CS-0140. Se generó un amplicón de 191 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció.

15

##### Aislamiento de un gen de $\Delta$ 6-elongasa de longitud completa de *Pyramimonas* CS-0140

Los cebadores se diseñaron para extender el fragmento de 191 bp por 5'- y 3'-RACE. El extremo 3' del gen se aisló usando el cebador directo específico de gen 5'-TTCGTGGATACGTTTCATCATGC-3' (SEQ ID NO:52) como se describió en el Ejemplo 1. Se generó un amplicón de 945 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló a partir de 1  $\mu$ g de ARN total de *Pyramimonas* CS-0140 usando el conjunto de elementos GeneRacer con una incubación para la transcripción reversa de 55°C durante 1 hora para generar ADNc adaptado en 5' como se describe en el manual adjunto. El cebador 5' GeneRacer y el cebador reverso específico de gen 5'-AGTTGAGCGCCGCGAGAAGTAC-3' (SEQ ID NO:53) se usaron en una amplificación por PCR usando la ADN polimerasa Pfu Ultra II Fusion. Este producto luego se diluyó 1:10 y se usó 1  $\mu$ l como molde en una segunda ronda de PCR usando el cebador interno 5' GeneRacer 5'-GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (SEQ ID NO:47) y el cebador reverso específico de gen 5'-ACCTGGTTGACGTTGCCCTTCA-3' (SEQ ID NO:54) usando las mismas condiciones de PCR como se las que se usaron en la primera ronda de amplificación. Se generó un amplicón de 743 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. Las tres secuencias parciales luego se ensamblaron en una secuencia de longitud completa predicha.

20

25

30

La región codificante de longitud completa con una región corta de la UTR 5' luego se amplificó a partir del ARN total por RT-PCR. El cebador directo 5'-GCTATGGAGTTCGCTCAGCCT-3' (SEQ ID NO:55) y el cebador reverso 5'-TTACTACTGCTTCTTGCTGGCCAGCT-3' (SEQ ID NO:56) se usaron con 100 ng de ARN total de *Pyramimonas* CS-0140. Se generó un amplicón de 900 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto del amplicón se da como SEQ ID NO:3 y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se da como SEQ ID NO:4.

35

El análisis por BLAST indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa (provista como SEQ ID NO:4) tiene similitud con otras  $\Delta$ 5-  $\Delta$ 6-elongasas. El grado máximo de identidad entre la elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 y otras proteínas (BLASTX) fue 54 % con AAV67797, la elongasa 1 de ácidos grasos poliinsaturados de *Ostreococcus tauri*. En la Figura 4 se provee un árbol de relación de secuencia basado en el alineamiento múltiple de secuencias similar a la elongasa de *Pyramimonas* CS-0140, incluyendo aquellas usadas para diseñar los

40

cebadores degenerados originales. El dominio de familia GNS1/SUR4 conservado (dominio conservado pfam01151 en NCBI) está representado en esta secuencia en los aminoácidos entre 52 y 297, que generalmente indica que la proteína está involucrada en los sistemas de elongación de ácidos grasos de cadena larga.

#### 5 *Caracterización funcional de la $\Delta$ 6-elongasa de Pyramimonas CS-0140 en levaduras*

La región codificante de la proteína entera de este clon, contenida en un fragmento *EcoRI* en pGEM-T Easy se insertó en pYES2 en el sitio *EcoRI*, generando el vector pYES2+Pyrco-Elo1 para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levaduras se transformaron con pYES2+Pyrco-Elo1 y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras que contienen pYES2+Pyrco-Elo1 se hicieron crecer en cultivo y luego se indujeron con galactosa para expresar el ADNc Pyrco-Elo1. Los ácidos grasos se agregaron al medio de cultivo en una concentración final de 0,5 mM y se cultivaron adicionalmente a 30°C durante 48 horas, luego de las cuales se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares totales. Cuando se agregó ALA al medio, la presencia de ETrA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 5,3 % de los FA totales, representando una eficacia de conversión (actividad  $\Delta$ 9-elongasa) del 9,3 %. Cuando se agregó SDA al medio, la presencia de ETA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 34,1 %, representando una eficacia de conversión del 65,6 %, un alto nivel de actividad  $\Delta$ 6-elongasa. Sin embargo, cuando se agregó EPA al medio, la presencia de DPA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes no se detectó (Tabla 5), indicando que el ADNc codificaba para actividad  $\Delta$ 6-elongasa con algo de actividad  $\Delta$ 9-elongasa, pero sin actividad  $\Delta$ 5-elongasa en las células de levaduras.

Los datos descritos anteriormente para los dos genes de  $\Delta$ 6-elongasa mostraron que el gen de *Pyramimonas* codificaba una enzima que era mucho más activa que el gen de *Micromonas*. Esto no era esperado. Las posibilidades de que la región codificante amplificada del ADN genómico de *Micromonas* contuviese una mutación o que la región codificante fuese incompleta no se excluyeron.

#### **Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica $\Delta$ 5-elongasa de microalgas**

##### *Aislamiento de un fragmento de gen de $\Delta$ 5-elongasa de Pyramimonas CS-0140*

La cepa *CS-0140* de *Pyramimonas* en la colección de microalgas vivas de CSIRO se identificó como una cepa de microalgas que tuvo un alto nivel nativo de  $\Delta$ 5- y  $\Delta$ 6-elongación (Tabla 4).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de elongasa de números de acceso al GenBank AAV67798 y ABO98084. A partir de varias secuencias apareadas, los inventores eligieron los bloques de secuencia de aminoácidos consenso YLELLDT (SEQ ID NO:35) y MYSYY (SEQ ID NO:36) correspondientes a las posiciones de aminoácidos 136-142 y 198-202, respectivamente, de AAV67798. Los cebadores degenerados 5'-ARTAYYTSGARYTRYTGAYAC-3' (SEQ ID NO:57) y 5'-CATKARRTARTASGAGTACAT-3' (SEQ ID NO:58) (abreviaturas como más arriba) se sintetizaron basándose en las secuencias de estos dos bloques. Se realizó una amplificación por RT-PCR usando el sistema de RT-PCR Superscript III One-Step como se describe en el Ejemplo 1. Luego se usaron 0,5  $\mu$ l de esta reacción como molde en una segunda ronda de PCR usando ADN polimerasa Taq (NEB) con los mismos cebadores. Se generó un amplicón de 200 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció.

##### *Aislamiento de un gen de $\Delta$ 5-elongasa de longitud completa de Pyramimonas CS-0140*

Los cebadores se diseñaron para extender el fragmento de 200 bp por 5'- y 3'-RACE. El extremo 3' del gen se aisló usando el cebador directo específico de gen 5'-CATCATACCTGTTGATCTGGTC-3' (SEQ ID NO:59) y un cebador reverso oligo-dT como en el Ejemplo 1. Se generó un amplicón de 408 bp, se ligó en pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló a partir de 1  $\mu$ g de ARN total de *Pyramimonas* CS-0140 usando el conjunto de elementos GeneRacer con una incubación para la transcripción reversa de 55°C durante 1 hora para generar el ADNc adaptado en 5' como se describe en el manual adjunto. El cebador reverso específico de gen 5'-CCAGATCAACAGGGTATGATGGT-3' (SEQ ID NO:60) se usó en la amplificación por PCR usando la ADN polimerasa PFU Ultra II Fusion como lo especifica el fabricante. Este producto luego se diluyó 1:10 y se usó 1  $\mu$ l como molde en una segunda ronda de PCR usando el cebador interno 5' GeneRacer 5'-GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (SEQ ID NO:47) y el cebador reverso específico de gen 5'-CGAAAGCTGGTCAAATTCTTGGCGCAT-3' (SEQ ID NO:61). Se generó un amplicón de 514 bp, se ligó en pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció. La secuencia de longitud completa se ensambló a partir de tres secuencias parciales.

La región codificante de longitud completa con una región corta de UTR 5' luego se amplificó a partir del ARN total por RT-PCR. El cebador directo 5'-AACATGGCGTCTATTGCGATTCCGGCT-3' (SEQ ID NO:62) y el cebador reverso 5'-TTATTACTGCTTCTTGGCACCTTGCT-3' (SEQ ID NO:63) se usaron en una amplificación por RT-PCR como se describió en el Ejemplo 1. Se generó un amplicón de 810 bp, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto del inserto como se provee como SEQ ID NO:5, y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por el ADNc se muestra como SEQ ID NO:6.

El análisis por BLAST indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa tuvo una homología con otras Δ5- y Δ6-elongasas. El análisis por BLASTP mostró que el máximo grado de identidad entre la elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 y otras proteínas en el banco de datos Genbank fue 46 %, con número de acceso ABR67690 correspondiente a la elongasa de *Pavlova viridis* C20. En la Figura 5 se provee un árbol de relación de secuencia basándose en el alineamiento múltiple de secuencias similar a la *Pyramimonas* CS-0140 elongasa, incluyendo aquellas usadas para diseñar los cebadores degenerados originales.

*Caracterización funcional de la Δ5-elongasa de Pyramimonas CS-0140 en levaduras*

La región codificante de la proteína entera de este clon, contenida en un fragmento *EcoRI* del ADNc en pGEM-T Easy se insertó en pYES2 en el sitio *EcoRI*, generando pYES2+Pyrco-Elo2 para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levaduras se transformaron con pYES2+Pyrco-Elo2 y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras conteniendo pYES2+Pyrco-Elo2 se hicieron crecer en cultivo y luego se indujeron con galactosa para expresar el ADNc. Luego del agregado de ácidos grasos al medio de cultivo y 48 horas de cultivo adicional a 30°C, se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares. Cuando se agregó ALA al medio, la presencia de ETrA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,3 % de FA totales, representando una eficacia de conversión del 0,5 % (actividad Δ9-elongasa). Cuando se agregó SDA al medio, la presencia de ETA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,7 %, representando una eficacia de conversión del 1,3 % (actividad Δ6-elongasa). Cuando se agregó EPA al medio, la presencia de DPA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 1,8 %, representando una eficacia de conversión sorprendente elevada del 75 %, indicando una actividad Δ5-elongasa fuerte en las células de levaduras (Tabla 6).

Los presentes inventores creen que dicha conversión eficaz de EPA a DPA en una célula recombinante no ha sido informada previamente. Se predice que la eficacia de conversión en las plantas para esta enzima será similarmente alta. El dominio de familia GNS1/SUR4 conservado (dominio conservado pfam01151 en NCBI) está representado en esta secuencia en los aminoácidos entre 50 y 267, que generalmente indica que la proteína está involucrada en los sistemas de elongación de ácidos grasos de cadena larga.

**Tabla 6.** Conversión de ácidos grasos en células de levaduras transformadas con construcciones genéticas que expresan elongasas aisladas de *Micromonas* CS-0170 y *Pyramimonas* CS-0140.

Clon	Precursor de ácido graso / % de FA totales	Ácido graso formado / % de FA totales	Tasa de conversión
pYES2+ Mic-Elo1	ALA, 18:3ω3 / 52,2 %	ETrA, 20:3ω3 / 0,2 %	0,4 %
pYES2+ Mic-Elo1	SDA, 18:4ω3 / 54,3 %	ETA, 20:4ω3 / 0,2 %	0,4 %
pYES2+ Mic-Elo1	EPA, 20:5ω3 / 2,0 %	DPA, 22:5ω3 / 0 %	0 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	ALA, 18:3ω3 / 51,4 %	ETrA, 20:3ω3 / 5,3 %	9,3 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	SDA, 18:4ω3 / 17,9 %	ETA, 20:4ω3 / 34,1 %	65,6 %
pYES2+ Pyrco-Elo1	EPA, 20:5ω3 / 2,1 %	DPA, 22:5ω3 / trazas	-
pYES2+ Pyrco-Elo2	ALA, 18:3ω3 / 56,4 %	ETrA, 20:3ω3 / 0,3 %	0,5 %
pYES2+ Pyrco-Elo2	SDA, 18:4ω3 / 51,7 %	ETA, 20:4ω3 / 0,7 %	1,3 %
pYES2+ Pyrco-Elo2	EPA, 20:5ω3 / 0,6 %	DPA, 22:5ω3 / 1,8 %	75,0 %

**Ejemplo 4. Aislamiento y caracterización de genes que codifican Δ6-desaturasa de microalgas**

*Síntesis de un gen de Δ6-desaturasa de longitud completa de Micromonas CCMP1545*

La secuencia genómica de modelos de proteína filtrados de *Micromonas* CCMP1545 producida por el Instituto de Genómica del Departamento de Energía de Estados Unidos (<http://www.jgi.doe.gov/>) se analizó con el programa BLASTP usando la secuencia de aminoácidos de la Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri*, número de acceso al Genbank AAW70159, como la secuencia de búsqueda. Este análisis reveló la presencia de una proteína predicha en *Micromonas* CCMP1545 que tuvo homología con AAW70159. La secuencia de proteína predicha de *Micromonas* CCMP1545 se usó para diseñar y sintetizar una secuencia de nucleótidos optimizada para codón que fue la más adecuada para la expresión en plantas dicotiledóneas tal como *Brassica napus*. La secuencia de nucleótidos de la región codificante de proteína se da en SEQ ID NO:7. La construcción plasmídica se designó pGA4. La secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID NO:8.

El análisis por BLASTP usando la secuencia de aminoácidos de la desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 SEQ ID NO:8 como búsqueda para otras proteínas en el banco de datos Genbank mostró que la proteína tuvo una homología con las  $\Delta 6$ -desaturasas. El mayor grado de identidad fue 66 % respecto de la longitud completa con la secuencia de aminoácidos de número de acceso AAW70159, la secuencia de una  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri*. En la Figura 6 se provee un árbol de relación de secuencia basándose en el alineamiento múltiple de secuencias similar a la desaturasa de *Micromonas* CCMP1545. Esta desaturasa *front-end* contiene un dominio de citocromo b5 (dominio conservado pfam00173 en NCBI) en los aminoácidos entre 54 y 104 y el dominio conservado de similar a  $\Delta 6$ -FADS (Dominio conservado cd03506 en NCBI) en los aminoácidos entre 172 y 428. Las tres cajas de histidina indicativas de una desaturasa *front-end* están presentes en esta secuencia en 190-195, 227-232 y 401-405, respectivamente. Las proteínas que contienen ambos de estos dominios son generalmente desaturasas *front-end* requeridas para la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados. Interesantemente, estas desaturasas se agrupan estrechamente con AAW70159, la única desaturasa de acil-CoA similar a plantas bioquímicamente confirmada publicada hasta la fecha.

#### 15 Caracterización funcional de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 en células de levaduras

La región codificante entera de la desaturasa de *Micromonas*, contenida en un fragmento *KpnI*-*SacI* del plásmido pGA4 se insertó en el vector para levaduras pYES2 en el sitio *KpnI*-*SacI*, generando pYES2+*Micd6D* para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levaduras se transformaron con pYES2+*Micd6D* y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras conteniendo pYES2+*Micd6D* se hicieron crecer en cultivo y luego se indujeron con galactosa. Luego de la adición de 0,5 mM de LA, ALA, ETrA, DGLA o ETA al medio de cultivo y 48 horas de cultivo adicional a 30°C, se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares totales. Cuando se agregó LA al medio, la presencia de GLA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 3,9 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 6$ -desaturación del 11,4 %. Cuando se agregó ALA al medio, la presencia de SDA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 13,9 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 6$ -desaturación del 39,0 %. Esto es, la eficacia de conversión para sustratos ácidos grasos  $\omega 3$  fue 3,5 veces mayor que para el correspondiente sustrato ácido graso  $\omega 6$ . Cuando se agregó ETrA al medio, la presencia de ETA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,21 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 8$ -desaturación del 8,0 %. Sin embargo, cuando se agregó tanto DGLA o ETA al medio, la presencia de ARA o EPA, respectivamente, no se detectó. Esto indicó la ausencia de cualquier actividad de  $\Delta 5$ -desaturación (Tabla 7).

35 **Tabla 7.** Conversión de ácidos grasos en células de levaduras transformadas con construcciones genéticas que expresan desaturasas aisladas de *Micromonas* CCMP1545, *Ostreococcus lucimarinus* y *Pyramimonas* CS-0140.

Clon	Precursor de ácido graso / % de FA totales	Ácido graso formado / % de FA totales	Tasa de conversión
pYES2+ Mic-d6D	LA, 18:2 $\omega$ 6 / 30,3 %	GLA, 18:3 $\omega$ 6 / 3,9 %	11,4 %
pYES2+ Mic-d6D	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 21,7 %	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 13,9 %	39,0 %
pYES2+ Mic-d6D	ETrA, 20:3 $\omega$ 3 / 2,4 %	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 0,21 %	8,0 %
pYES2+ Mic-d6D	DGLA, 20:3 $\omega$ 6 / 2,6 %	ARA, 20:4 $\omega$ 6 / 0 %	-
pYES2+ Mic-d6D	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 6,2 %	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 0 %	-
pYES2+ Ostlu-d6D	LA, 18:2 $\omega$ 6 / 29,5 %	GLA, 18:3 $\omega$ 6 / 2,1 %	6,6 %
pYES2+ Ostlu-d6D	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 21,8 %	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 13,8 %	38,8 %
pYES2+ Ostlu-d6D	ETrA, 20:3 $\omega$ 3 / 2,2 %	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 0 %	-
pYES2+ Ostlu-d6D	GLA, 18:3 $\omega$ 6 / 29,2 %	18:4 $\omega$ 6 / 0 %	-
pYES2+ Ostlu-d6D	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 41,7 %	18:5 $\omega$ 3 / 0 %	-
pYES2+ Ostlu-d6D	DGLA, 20:3 $\omega$ 6 / 2,3 %	ARA, 20:4 $\omega$ 6 / 0 %	-
pYES2+ Ostlu-d6D	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 4,9 %	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 0 %	-
pYES2+ Pyrco-d5D	LA, 18:2 $\omega$ 6 / 35,1 %	GLA, 18:3 $\omega$ 6 / 0 %	-

pYES2+ Pyrco-d5D	ALA, 18:3 $\omega$ 3 / 40,9 %	SDA, 18:4 $\omega$ 3 / 0 %	-
pYES2+ Pyrco-d5D	DGLA, 20:3 $\omega$ 6 / 2,9 %	ARA, 20:4 $\omega$ 6 / 0,12 %	4,0 %
pYES2+ Pyrco-d5D	ETA, 20:4 $\omega$ 3 / 7,2 %	EPA, 20:5 $\omega$ 3 / 0,26 %	3,5 %

#### Caracterización funcional de la $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas CCMP1545* en células vegetales

5 Las actividades enzimáticas de  $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (Mic1545-d6D) y una  $\Delta$ 6-desaturasa de *Echium plantagineum* (Echpl-d6D; Zhou *et al.*, 2006), usadas en la presente como una muestra de control positivo, se demostró en plantas usando un sistema mejorado de expresión transitorio en *Nicotiana benthamiana* como se describió en el Ejemplo 1. Se hizo un vector designado 35S-pORE04 por inserción de un fragmento *Pst*I conteniendo un promotor 35S en el sitio *Sfo*I del vector pORE04 luego del tratamiento con ADN polimerasa T4 para hacer romos los extremos (Coutu *et al.*, 2007). Se hizo una construcción genética 35S:Mic1545-d6D por inserción de la región codificante entera de pGA4, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Sma*I-*Eco*RV, generando pJP2064.

15 Estos vectores quiméricos se introdujeron en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y las células de cultivos de estos se infiltraron en tejidos de hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* en el vivero. Las plantas se hicieron crecer durante otros cinco días luego de la infiltración antes de tomar los discos de hojas para el análisis por GC que reveló que ambos genes fueron funcionales como  $\Delta$ 6-desaturasa en *Nicotiana benthamiana*.

20 El tejido de hojas transformado con la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Echium plantagineum* contuvo GLA (0,4 %) y SDA (1,2 %), que representó eficacias de conversión del 3,8 % y 4,4 %, respectivamente. El tejido de hojas transformadas con la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 contuvo SDA (2,2 %) que representó una eficacia de conversión del 6,9 % sin detección de GLA. La ausencia de GLA en el tejido de hojas se puede deber a una preferencia extrema en la planta por el sustrato  $\omega$ 3 ALA en comparación con el sustrato  $\omega$ 6 LA, o en parte por la presencia de actividad nativa como  $\omega$ 3 desaturasa de *Nicotiana benthamiana* que podría convertir algo del GLA producido por la  $\Delta$ 6-desaturación a SDA. Dichos efectos han sido vistos como probables en experimentos previos describiendo acil-PC  $\Delta$ 6-desaturasas con preferencia por sustratos  $\omega$ 3 (Sayanova *et al.*, 2006), a pesar que en ese estudio no se cuantificó la extensión en la que esto ocurre.

#### Preferencia por sustrato omega-3 de $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas*

30 La  $\Delta$ 6-desaturasa aislada de *Micromonas* tuvo una sorprendentemente fuerte preferencia por sustratos  $\omega$ 3 en plantas, así como en levaduras. La enzima expresada en células de levaduras se observó que tuvo una actividad 3,5 veces mayor sobre sustratos ácidos grasos  $\omega$ 3-desaturados que los correspondientes sustratos ácidos grasos  $\omega$ 6-desaturados. La preferencia observada por sustratos  $\omega$ 3 fue absolutamente sorprendente e inesperada basándose en la informada falta de preferencia por la enzima *O. tauri* (Domergue *et al.*, 2005). Los informes sobre la expresión de la  $\Delta$ 6-desaturasa de *O. tauri* en levaduras o en semillas de plantas indican actividad similar sobre LA y ALA.

40 El uso de este gen u otros genes con dicha alta especificidad por sustratos ácidos grasos  $\omega$ 3-desaturados junto con otras desaturasas y elongasas de ácidos grasos como parte de una vía VLC-PUFA recombinante en plantas se predijo por lo tanto que aumenta los niveles de EPA, DPA y DHA en relación al uso de desaturasas sin preferencia por sustratos  $\omega$ 3-desaturados. Dicho aumento se predijo que ocurre como un resultado de la reducción de la conversión de LA a GLA y los posteriores  $\omega$ 6 PUFAs DGLA y ARA que no son eficazmente convertidos en las plantas a sus equivalentes  $\omega$ 3 por  $\Delta$ 17-desaturasas de hongos o levaduras. Mientras que una  $\Delta$ 6-desaturasa con una preferencia por sustratos ácidos grasos  $\omega$ 3 ha sido aislada (Sayanova *et al.*, 2003), tuvo actividad sobre cadenas acilo unidas a fosfolípidos. Por otra parte, se predice que la desaturasa obtenida a partir de *Micromonas* tiene una actividad sobre sustratos acil-CoA.

#### Función dual $\Delta$ 6/ $\Delta$ 8 de $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545

50 Fue interesante indicar que la  $\Delta$ 6-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 mostró un nivel significativo de actividad  $\Delta$ 8-desaturasa y por lo tanto tuvo actividades dual significativas, en contraste a la enzima de *Ostreococcus lucimarinus* que no tuvo actividad detectable de  $\Delta$ 8-desaturasa (más abajo). La actividad desaturasa dual se predice que es útil en la construcción de vías  $\Delta$ 6/ $\Delta$ 8-desaturasa duales en plantas, o donde la elongasa que es usada en la construcción de dichas vías tiene ambas actividades  $\Delta$ 9-elongasa y  $\Delta$ 6-elongasa. El uso de dicho gen podría ayudar a reducir la acumulación de ETrA por conversión de éste a ETA, que podría ser entonces  $\Delta$ 5-desaturado a EPA.

#### Síntesis de un gen de $\Delta$ 6-desaturasa de longitud completa de *Ostreococcus lucimarinus*

60 El banco de datos GenBank de las secuencias de proteínas no redundantes se analizó por BLASTX usando la secuencia de nucleótidos de  $\Delta$ 6-desaturasa de *Ostreococcus tauri* (número de acceso AY746357) como la secuencia de búsqueda. A partir de este análisis, se identificó un gen de *Ostreococcus lucimarinus* que codificaba

para una proteína de longitud parcial con secuencia de aminoácidos de número de acceso XP\_001421073. Luego se examinaron las secuencias de ADN genómicas que flanquean la región que codifica XP\_001421073 para identificar los codones putativos de inicio y de finalización para definir la región codificante de la proteína de longitud completa, cuya secuencia de nucleótidos se da como SEQ ID NO:9. La región codificante luego se tradujo a una secuencia de proteína, dada como SEQ ID NO:10. Esta secuencia de aminoácidos se usó para diseñar y sintetizar una secuencia de nucleótidos optimizada para codones que fue más adecuada para la expresión en *Brassica napus* y otras plantas dicotiledóneas, que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:11.

El análisis por BLASTP usando la secuencia de aminoácidos de *Ostreococcus lucimarinus* como búsqueda de otras proteínas en el banco de datos Genbank mostrada como SEQ ID NO:10 tuvo homología con  $\Delta 6$ -desaturasas. El mayor grado de identidad a lo largo de la secuencia de longitud completa fue 76 % con la secuencia de aminoácidos de número de acceso AAW70159, la secuencia para la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri*. En la Figura 7 se provee un árbol de relación de secuencia basándose en el alineamiento múltiple de secuencias similar a la desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*. Esta desaturasa *front-end* contuvo un dominio de citocromo b5 (dominio conservado pfam00173 en NCBI) en los aminoácidos 55 a 108 y el dominio conservado similar a  $\Delta 6$ -FADS (dominio conservado cd03506 en NCBI) en los aminoácidos 198 a 444. Las tres cajas de histidina indicativas de una desaturasa *front-end* están presentes en esta secuencia en los aminoácidos 207-212, 244-249 y 417-421. Las proteínas que contienen ambos de estos dominios son generalmente desaturasas *front-end* requeridas para la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados. Interesantemente, esta desaturasa se agrupa estrechamente con AAW70159, la única desaturasa de acil-CoA similar a plantas bioquímicamente confirmada publicada hasta la fecha.

#### Caracterización funcional de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* en células de levaduras

La región codificante entera del gen de *Ostreococcus* (SEQ ID NO:11), contenido en un fragmento *NotI* en pGEM-T Easy se insertó en pYES2 en el sitio *NotI*, generando el vector quimérico pYES2+OstIud6D, para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levaduras se transformaron con pYES2+OstIud6D y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras conteniendo pYES2+OstIud6D se hicieron crecer en cultivo y luego se indujeron con galactosa. Luego de la adición de LA, ALA, SDA o EPA, cada uno en una concentración final de 0,5 mM en el medio de cultivo, y 48 horas de cultivo adicional a 30°C, se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares. Cuando se agregó el sustrato LA al medio, la presencia de producto GLA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 2,1 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 6$ -desaturación del 6,6 %. Cuando se agregó el sustrato ALA al medio, la presencia de producto SDA se detectó al 13,8 % de FA totales en los lípidos celulares de las levaduras transformantes, representando una eficacia de conversión  $\Delta 6$ -desaturación del 38,8 %. Sin embargo, cuando cualquiera de ETrA, DGLA o ETA se agregó al medio, no se detectó la presencia de ETA, ARA o EPA, respectivamente. Esto indicó la ausencia de cualquier actividad de  $\Delta 5$ - o  $\Delta 8$ -desaturación (Tabla 7), y también una preferencia por el sustrato ácido graso  $\omega 3$  en relación al correspondiente ácido graso  $\omega 6$  de la misma longitud y patrón de insaturación.

#### Especificidad por el sustrato acil-CoA de las desaturasas

Las desaturasas descritas en este Ejemplo estuvieron más estrechamente relacionadas con la  $\Delta 6$ -desaturasa previamente aislada de *Ostreococcus tauri* que con otras  $\Delta 6$ -desaturasas (Figura 9). Esta similitud fue además remarcada cuando se produjo un árbol filogenético de estos genes junto con otros miembros de la familia de desaturasas (Figura 10). La  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* ha sido informada como activa sobre sustratos acil-CoA (Domergue *et al.*, 2005). Basándose en estas observaciones, se predijo que las  $\Delta 6$ -desaturasas codificadas por estos genes descritos anteriormente también serían activas sobre sustratos acil-CoA en lugar de sobre sustratos acil-PC. Interesantemente, la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* también se agrupó con la  $\Delta 6$ -desaturasa de *O. tauri* y la  $\Delta 8$ -desaturasa formó una rama separada.

Para establecer si la  $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* (Micromonas CCMP1545) tiene la capacidad de usar los ácidos grasos acil-CoA como sustratos y de este modo producir ácidos grasos acil-CoA  $\Delta 6$ -desaturados, se transformó *S. cerevisiae* con una construcción de gen codificando sólo para la desaturasa y cultivos por triplicado de las líneas celulares transformantes crecidas en presencia de 18:3 <sup>$\Delta 9,12,15$</sup>  exógeno 250  $\mu$ M. Los lípidos totales luego se extrajeron de los cultivos y se fraccionaron en clases de lípidos neutros (NL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) por cromatografía de capa delgada (TLC), luego de lo cual se produjeron FAME de cada clase y se analizaron por GC. Los datos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Composición de ácidos grasos (por ciento de ácidos grasos totales) de lípidos totales y lípidos neutros (NL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) fraccionados de *S. cerevisiae* transformada con la  $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* clonada en pYES2.

Ácido graso	Total	NL	PC	PI	PS	PE
16:0	24,3 $\pm$ 1,5	24,5 $\pm$ 4,3	36,8 $\pm$ 3,4	45,6 $\pm$ 2,4	45,8 $\pm$ 3,9	37,0 $\pm$ 3,9
16:1 <sup><math>\Delta 3t</math></sup>	14,7 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,7	19,4 $\pm$ 1,0	21,5 $\pm$ 3,5

18:0	8,1±0,7	11,5±1,4	11,7±0,7	17,4±3,1	0,9±1,3	3,6±3,8
18:1 <sup>Δ9</sup>	11,0±1,3	10,0±2,0	7,0±1,2	14,6±0,9	26,3±1,8	18,6±2,5
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	12,1±0,7	12,2±2,4	7,1±0,8	5,6±0,1	2,3±2,0	6,9±2,3
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	29,4±0,9	<b>29,4±1,9</b>	<b>21,0±0,2</b>	7,7±0,7	4,1±0,3	9,9±1,9
Otros	0,3	0,3	0,8	1,1	1,2	2,5
Total	100	100	100	100	100	100

En los lípidos totales, el 71 % de 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> ha sido Δ6-desaturado a 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>. No se detectó enriquecimiento del producto en la fracción PC cuando se comparó con el extracto de lípidos totales. Por cierto, hubo un porcentaje sustancialmente menor de 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> en la fracción PC que en los lípidos totales (21,0 % vs. 29,4 %), indicando que la desaturasa estaba produciendo 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> como un tioéster acil-CoA (Domergue *et al.*, 2003).

El gen que codifica la Δ6-desaturasa de *M. pusilla* también se introdujo en plantas *Arabidopsis* por transformación. Se generó una construcción genética Linin: Micpu-d6D por inserción de la región codificante entera de la Δ6-desaturasa de *M. pusilla*, contenida en un fragmento *Swal*, en Linin-pWVEC8 en el sitio *Smal*, generando linP-mic1545-d6D-linT. El promotor para esta construcción fue el promotor de linina específico de semilla de lino. Esta construcción se transformó en *A. thaliana* ecotipo Columbia y la composición de ácidos grasos en las semillas T2 de las plantas transformadas se analizó por GC (Figura 11).

Los estudios bioquímicos en levaduras y en *N. benthamiana* proveyeron evidencia de que la Δ6-desaturasa de *M. pusilla* es una acil-CoA desaturasa. El análisis de la cinética de un consiguiente paso de elongación ha sido usado en otros estudios como un método indirecto para determinar la capacidad de una desaturasa para producir un producto acil-CoA: la disponibilidad del producto Δ6-desaturado (SDA) para el posterior paso de Δ6-elongación, que ocurre en el conjunto metabólico de acil-CoA, se ve afectado por la especificidad de sustrato de la Δ6-desaturasa (Domergue *et al.*, 2003, 2005; Hoffmann *et al.*, 2008). Se obtuvieron tasas similares de Δ6-elongación cuando se usaron las Δ6-desaturasas de *O. tauri* y *M. pusilla*, en contraste con el nivel significativamente más bajo de elongación observado cuando se usó la acil-PC Δ6-desaturasa de *E. plantagineum* (Figura 12a). Se observó evidencia adicional cuando se analizó la distribución del producto SDA de Δ6-desaturasa en las clases de lípidos de levaduras (Tabla 8). No se observó enriquecimiento en la fracción PC cuando se comparó con la fracción de lípidos totales a pesar que dicho enriquecimiento hubiese sido esperado si y cuando el SDA fuera producido por una acil-PC desaturasa (Domergue *et al.*, 2005). Los niveles relativamente bajos de Δ6-desaturación observados en nuestro estudio (Figura 12) fueron esperados ya que gran parte de los sustratos LA y ALA en las hojas de *N. benthamiana* están localizados en el plástido y no están disponibles para la desaturación. Sin embargo, debido a que estos ácidos grasos también se aíslan durante la preparación de FAME su presencia reduce eficazmente la eficacia de conversión global calculada. Por lo tanto, se esperaría que las eficacias de conversión específicas de semilla fueran mucho mayores con los mismos genes.

#### Comparación entre acil-CoA y acil-PC Δ6-desaturasas

Se hicieron comparaciones adicionales entre Δ6-desaturasa de *Micromonas* CCMP1545, Δ6-desaturasa de *Echium plantagineum* y Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri* (Domergue *et al.*, 2005) en células vegetales. Las construcciones genéticas 35S: Mic1545-d6D y 35S: Echpl-d6D como se describen en el Ejemplo 4 se compararon con una construcción genética 35S: Ostta-d6D que fue hecha por inserción de la región codificante entera de la Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri*, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP3065.

Las comparaciones directas entre las vías de *E. plantagineum* y tanto de *O. tauri* y *M. pusilla* EPA mostraron que las vías de acil-CoA desaturasa produjeron niveles mucho mayores de EPA debido a una Δ6-desaturación más eficiente y una posterior Δ6-elongación más eficiente (Figura 12a). La Δ6-desaturasa de *E. plantagineum* catalizó la conversión de 14 % del sustrato ω3 (18:3<sup>Δ9,12,15</sup> a 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>) y 30 % del sustrato ω6 (18:2<sup>Δ9,12</sup> a 18:3<sup>Δ6,9,12</sup>). El uso de la Δ6-desaturasa *O. tauri* dio como resultado un 24 % de conversión ω3 y 40 % de conversión ω6 mientras que el uso de la Δ6-desaturasa de *M. pusilla* dio como resultado un 27 % de conversión ω3 y 15 % de conversión ω6. Estas conversiones dieron como resultado la producción de 1,3 % de 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup> y 3,4 % de 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup> para la vía de *E. plantagineum*, 1,2 % de 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup> y 9,6 % de 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup> para la vía de *O. tauri* y 0,6 % de 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup> y 10,7 % de 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup> para la vía de *M. pusilla*.

La Δ6-elongación fue mucho mayor cuando las Δ6-desaturasas de *O. tauri* o *M. pusilla* produjeron el sustrato 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> en comparación a cuando se usó la desaturasa de *E. plantagineum* (Figura 12a). Además de la especificidad de sustrato ω3 mostrada por la Δ6-desaturasa de *M. pusilla*, se probó que la Δ6-elongasa de *P. cordata* (véase el Ejemplo 2) fue altamente específica y convirtió el sustrato ω3 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> a una velocidad mucho más alta que 18:3<sup>Δ6,9,12</sup> (89 % y 21 %, respectivamente, para la vía de EPA de *M. pusilla*).

*Uso de las vías de  $\Delta 6$ -desaturasas duales*

Se hicieron comparaciones en las cuales se exploró la posibilidad de aumentar la  $\Delta 6$ -desaturación por medio del uso de una vía conteniendo dos  $\Delta 6$ -desaturasas. Primero, la combinación de la acil-PC desaturasa de *E. plantagineum* y la acil-CoA desaturasa de *M. pusilla* no aumentaron significativamente las eficacias de conversión por encima de aquellas vistas en una vía conteniendo sólo la desaturasa de *M. pusilla* (Figura 12b). Se obtuvieron resultados similares cuando se combinaron  $\Delta 6$ -desaturasas de *E. plantagineum* y de *O. tauri*. Una vía de acil-CoA  $\Delta 6$ -desaturasa dual en la cual se combinaron las desaturasas de *O. tauri* y de *M. pusilla* tampoco dieron como resultado el aumento en las eficacias de conversión  $\omega 3$  cuando se comparó con las vías de *O. tauri* o *M. pusilla* (Figura 12c).

También se ensayó el efecto del uso de  $\Delta 6$ -desaturasas duales en una vía de producción de EPA. El primer ensayo fue combinar la acil-PC desaturasa de *E. plantagineum* con ambas de las acil-CoA desaturasas en experimentos separados. Se teorizó que el agregado de una desaturasa unida a lípidos podría aumentar la conversión de cualquier sustrato acil-PC LA o ALA a GLA o SDA, respectivamente. Similarmente, los inventores también ensayaron si el uso de dos acil-CoA desaturasas podría aumentar la acumulación de EPA. Ninguno de estos escenarios se probó como verdaderos en los ensayos transitorios en *N. benthamiana*.

**Ejemplo 5. Aislamiento y caracterización de genes que codifican  $\Delta 5$ -desaturasa de una microalga***Aislamiento de un fragmento del gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de Pyramimonas CS-0140*

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la desaturasa de los números de acceso al GenBank ABL96295, ABP49078, XP\_001421073, AAM09687, AAT85661, AAW70159 y AAX14505 identificó los bloques de la secuencia de aminoácidos consenso WKNMHNKHHA (SEQ ID NO:37) y HHLFSPMP (SEQ ID NO:38) correspondiente a las posiciones de aminoácidos 197-206 y 368-375, respectivamente, de ABL96295. Se diseñaron los cebadores degenerados 5'-GGTGGGAAGAACAAGCACAAACrdncaycaygc-3' (SEQ ID NO:64) y 5'-GGGCATCGTGGGGwanarrtrtg-3' (SEQ ID NO:65) utilizando el programa CODEHOP (Rose *et al.*, 1998) basado en las secuencias de estos dos bloques. Se llevó a cabo una amplificación por PCR con rampa decreciente de temperatura [touchdown] utilizando ADN polimerasa Taq (NEB) en un volumen de 20  $\mu$ l usando 10 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN genómico de *Pyramimonas* CS-0140 con una solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como se especifica en el manual de instrucciones adjunto. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos; 20 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 70°C durante 2 minutos (-1°C por ciclo), 72°C durante 1 minuto; 20 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos; mantenido a 4°C. Se generó un amplicón de 551 pb, se ligó en pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció.

*Aislamiento de un gen de  $\Delta 5$ -desaturasa de longitud completa de Pyramimonas CS-0140*

Los cebadores se diseñaron para extender el fragmento de 551 pb por 5' y 3'-RACE y se usaron como se describe en el Ejemplo 1. El extremo 3' del ADNc del gen que codifica la  $\Delta 5$ -desaturasa se aisló usando el cebador directo específico de gen 5'-AGCGAGTACCTGCATTGGGT-3' (SEQ ID NO:66) y un cebador reverso oligo-dT modificado como en el Ejemplo 1. Se generó un amplicón de 477 pb, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló a partir del método de transferencia terminal modificado como en el Ejemplo 1. El cebador reverso específico de gen era 5'-ATAGTGCTTGGTGCGCAAGCTGTGCCT-3' (SEQ ID NO:67). Luego de dos rondas de amplificación por PCR, se generó un amplicón de 317 pb, se ligó en pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció. Las tres secuencias parciales luego se ensamblaron en una secuencia de longitud completa predicha.

La región codificante de longitud completa con una región corta de la UTR 5' luego se amplificó a partir del ADN genómico. El cebador directo 5'-CACCATGGGAAAGGGAGGCAATGCT-3' (SEQ ID NO:68) y el cebador reverso 5'-TTACTAGTGCCTTGGAGTGAGAT-3' (SEQ ID NO:69) se usaron en la amplificación por PCR usando la ADN polimerasa PFU Ultra II Fusion (Stratagene) en un volumen de 20  $\mu$ l usando 4 pmol de cada cebador y 50 ng de ADN genómico de *Pyramimonas* CS-0140 con solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como se especifica en el manual de instrucciones adjunto de PFU Ultra II Fusion. Se generó un amplicón de 1336 pb representando el ADNc de longitud completa, se ligó en pGEM-T Easy y se secuenció. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto del ADNc se da como SEQ ID NO:12.

El análisis por BLAST indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa que codifica el gen, que se da como SEQ ID NO:13, codifica para una proteína con homología a las conocidas  $\Delta 5$ - o  $\Delta 6$ -desaturasas. Estos dos tipos de desaturasas son similares a nivel de los aminoácidos y la actividad que codifica sólo a partir de la secuencia de aminoácidos es incierta. El análisis de actividad enzimática se llevó a cabo como se describe a continuación, demostrando que la proteína codificada tenía actividad de  $\Delta 5$ -desaturasa. El análisis por BLASTP mostró que el máximo grado de identidad entre la desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140 y otras desaturasas en el banco de datos Genbank fue de 52 %, con número de acceso EDQ92231, que es la secuencia de aminoácidos de una proteína con actividad enzimática indefinida de *Monosiga brevicollis* MX1. En la Figura 8 se provee un árbol de relación de secuencia basándose en el alineamiento múltiple de secuencias similar a la desaturasa de *Pyramimonas* CS-0140, incluyendo aquellas usadas para diseñar los cebadores degenerados originales. Esta desaturasa *front-end* contiene un dominio de citocromo b5 (dominio conservado pfam00173 en NCBI) en los aminoácidos entre 16 y 67 y el

dominio conservado similar a  $\Delta 6$ -FADS (dominio conservado cd03506 en NCBI) en los aminoácidos entre 159 y 411. Las tres cajas de histidina indicativas de una desaturasa *front-end* están presentes en esta secuencia en 175-180, 212-217 y 384-388. Las proteínas que contienen ambos de estos dominios son generalmente desaturasas *front-end* requeridas para la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados.

5

#### Caracterización funcional de la $\Delta 5$ -desaturasa de *Pyramimonas CS-0140* en levaduras

La región codificante entera de este clon, contenida en un fragmento *NotI* en pGEM-T Easy se insertó en pYES2 (Invitrogen) en el sitio *NotI*, generando pYES2+Pyrco-des2 para la introducción y caracterización funcional en levaduras. Las células de la cepa INVSC1 de levadura (Invitrogen) se transformaron con pYES2+Pyrco-des2 y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levaduras conteniendo pYES2+Pyrco-des2 se hicieron crecer en cultivo y luego se indujeron con galactosa. Luego de la adición de LA, ALA, DGLA o ETA 0,5 mM al medio de cultivo y 48 horas de cultivo adicional a 30°C, se analizaron los ácidos grasos en los lípidos celulares totales. Cuando se agregó DGLA al medio, la presencia de ARA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,12 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 5$ -desaturación del 4,0 %. Cuando se agregó ETA al medio, la presencia de EPA en los lípidos celulares de las levaduras transformantes se detectó como el 0,26 % de FA totales, representando una eficacia de conversión  $\Delta 6$ -desaturación del 3,5 %. Sin embargo, cuando se agregó tanto LA o ALA al medio, no se produjo GAL o SDA, respectivamente, en las levaduras transformantes. Esto indicó que la proteína carecía de cualquier actividad de  $\Delta 6$ -desaturación en las células de levaduras (Tabla 7).

20

#### Expresión de $\Delta 5$ -desaturasa de *Pyramimonas cordata* en células de plantas

Las actividades de enzima de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas CCMP1545* (SEQ ID NO:8 codificada por SEQ ID NO:7), *Pyramimonas CS-0140*  $\Delta 6$ -elongasa (SEQ ID NO:4 codificada por SEQ ID NO:3) y *Pyramimonas CS-0140*  $\Delta 5$ -desaturasa (SEQ ID NO:13 codificada por SEQ ID NO:12) junto con *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (SEQ ID NO:74 codificada por SEQ ID NO:75) se demostraron en plantas usando un sistema mejorado de expresión transitorio en *Nicotiana benthamiana* como se describió en el Ejemplo 1.

25

Se hizo una construcción genética 35S:Pyrco-d5D que codifica  $\Delta 5$ -desaturasa bajo el control del promotor constitutivo 35S por inserción de la región codificante entera de  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pyramimonas CS-0140*, contenida en un fragmento *EcoRI*, en 35S-pORE04 (Ejemplo 4, más arriba) en el sitio *EcoRI*, generando 35S:Pyrco-d5D. Los vectores quiméricos 35S:mic1545-d6D (Ejemplo 10), 35S:Pyrco-d6E (Ejemplo 10) y 35S:Pyrco-d5D se introdujeron individualmente en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y las células transgénicas de los cultivos de estos se mezclaron y la mezcla se infiltró en tejidos de hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* en el vivero. Las plantas se hicieron crecer durante otros cinco días luego de la infiltración antes de tomar los discos de hojas para el análisis por CG que reveló que estos genes funcionaban para producir EPA en *Nicotiana benthamiana*. El tejido de hojas transformado con estos genes contenía SDA (1,0 %), ETA (0,1 %), EPA (10,0 %). El tejido de hojas también contenía niveles traza de GLA, ETA y ARA. La eficacia de conversión de  $\Delta 5$ -desaturasa se calculó que era de 98,8 %.

35

Este experimento demuestra que las  $\Delta 5$ -desaturasas de microalgas son capaces de convertir ETA en EPA con una eficiencia de al menos 90 % o al menos 95 % en células de plantas.

#### 45 **Ejemplo 6. Aislamiento y caracterización de genes que codifican $\omega 3$ -desaturasa de microalgas**

##### *Aislamiento de un fragmento del gen $\omega 3$ -desaturasa de *Micromonas CS-0170**

En un intento por determinar si las microalgas tales como *Micromonas* tienen genes que codifican  $\omega 3$  desaturasas y quizás identificar dicho gen, se hizo una búsqueda de genes que muestran homología con FAD3 de la secuencia genómica de la cepa *RCC299 de Micromonas*. Sin embargo, esta búsqueda fracasó en identificar algún gen candidato. Por lo tanto, los inventores consideraron si una  $\omega 3$  desaturasa podría estar representada en otros tipos de desaturasas en *Micromonas*. Esta hipótesis se apoyaba en el hallazgo (Ejemplo 4) de que la  $\Delta 6$  desaturasa en la misma cepa era *front-end*, del tipo acil-CoA dependiente. Sin embargo, cuando se examinó, el genoma de *Micromonas RCC299* parecía contener genes para al menos 30 desaturasas de ácidos grasos putativas y no había información sobre cuál de éstas, si en efecto alguna, podría codificar para una  $\omega 3$  desaturasa.

55

En un experimento, un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de desaturasas de los números de acceso al GenBank BAD91495, ABL63813, BAD11952 y AAR20444 identificó los bloques de secuencia de aminoácidos consenso WCIGHDCG (SEQ ID NO:39) y TFLQHHDEDM (SEQ ID NO:40) correspondiente a las posiciones de aminoácidos 106-113 y 296-305, respectivamente, de BAD91495. Los cebadores degenerados 5'-TGTGGTGCATCGGCCAYGANKSNGG-3' (SEQ ID NO:70) y 5'-TGTCCTCGTCGTTGTGCTGNARRWANGT-3' (SEQ ID NO:71) se diseñaron usando el programa CODEHOP basado en las secuencias de estos dos bloques. Se llevó a cabo una amplificación por PCR *touchdown* utilizando ADN polimerasa Taq (NEB) en un volumen de 20  $\mu$ l usando 10 pmol de cada cebador, 50 ng de ADN genómico de *Micromonas CS-0170* con solución amortiguadora y componentes de nucleótidos como se especifica en el manual de instrucciones adjunto. Las condiciones de ciclado

65

fueron: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos; 20 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 70°C durante 2 minutos (-1°C por ciclo), 72°C durante 1 minuto; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos; mantenido a 4°C. Se generó un amplicón de 528 pb, se ligó en pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció. La secuencia de nucleótidos de este amplicón se provee como SEQ ID NO:14, y la secuencia parcial de la proteína codificada se provee como SEQ ID NO:15.

#### Síntesis de un gen de $\omega$ 3-desaturasa de longitud completa de *Micromonas* RCC299

El fragmento de 528 pb generado a partir de la PCR degenerada se comparó con los modelos de proteínas filtrados para la secuencia genómica completa de *Micromonas* RCC299 (producido por el Instituto de Genómica del Departamento de Energía de Estados Unidos <http://www.jgi.doe.gov/>). El análisis por BLAST reveló regiones de alta homología entre una región del cromosoma 13 de *Micromonas* RCC299 y SEQ ID NO:14. Basado en la cercana identidad de las dos secuencias es probable que las cepas CS-0170 y RCC299 de *Micromonas* estuvieran relacionadas muy estrechamente (la secuencia de nucleótidos de *Micromonas* RCC299 se provee como SEQ ID NO:16). La secuencia de proteína predicha de *Micromonas* RCC299 (SEQ ID NO:17) se usó para diseñar y sintetizar una secuencia de nucleótido de codón optimizada que era la más adecuada para la expresión en *Brassica napus* u otras plantas dicotiledóneas (SEQ ID NO:18). Una versión más corta de este gen que comienza en el nucleótido 164 de SEQ ID NO:18 se testeó en levaduras, pero no se detectó actividad  $\omega$ 3 desaturasa.

El análisis por BLAST indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID NO:17) tiene homología con FAT-1, FAT-2 y  $\omega$ 3 desaturasas. No fue posible predecir solamente a partir de la secuencia cuál era la actividad codificada. El grado máximo de identidad entre la desaturasa de *Micromonas* CS-0170 y otras proteínas en el banco de datos Genbank a partir de BLASTX fue 35 % con XP\_001899085.1, que era una proteína de *Brugia malayi* de la familia de desaturasa de ácidos grasos. Esta desaturasa *front-end* contuvo un dominio conservado similar a  $\Delta$ 12-FADS (dominio conservado cd03507 en NCBI). Las proteínas que contienen ambos de estos dominios son generalmente desaturasas *front-end* requeridas para la síntesis de ácidos grasos, incluyendo la familia  $\omega$ 3 desaturasa.

#### Caracterización funcional de la $\omega$ 3-desaturasa de *Micromonas* RCC299 en planta

La función enzimática de la  $\omega$ 3-desaturasa putativa codificada para el gen de longitud completa aislado a partir de *Micromonas* RCC299 (Mic299-w3D, como se describe anteriormente) y la  $\Delta$ 17-desaturasa de *Phytophthora infestans* (Phyin-d17D, número de acceso al Genbank CAM55882), usado aquí como una muestra de control positivo, se testeó en plantas usando un sistema mejorado de expresión transitorio en *Nicotiana benthamiana* como se describió anteriormente.

La construcción 35S:Mic299-w3D se hizo a partir del clonado de la región codificante entera de la proteína de SEQ ID NO:18, contenida en un fragmento *EcoRI*, en un vector 35S-pORE04 (Ejemplo 4) en el sitio *EcoRI*, generando la construcción genética designada pJP2073. La construcción 35S:Phyin-d17D a partir del clonado de la región codificante entera de la  $\Delta$ 17 desaturasa de *Phytophthora infestans*, contenida en un fragmento *EcoRI*, en 35S-pORE04 en el sitio *EcoRI*, generando pJP2074. Similarmente, se hizo una construcción 35S:Arath-DGAT1 a partir del clonado de la región codificante entera de *Arabidopsis thaliana* DGAT1 (AF051849), contenida en un fragmento *EcoRI*, en 35S-pORE04 en el sitio *EcoRI*, generando pJP2078.

La cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* se hizo crecer a 28°C en caldo LB suplementado con kanamicina 50 mg/ml y rifampicina 50 mg/ml hasta fase estacionaria. Las bacterias se aglomeraron por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser resuspendidas a OD600 = 1,0 en una solución amortiguadora de infiltración conteniendo MES 10 mM pH 5,7, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y acetosiringona 100  $\mu$ M. Las células luego se incubaron a 28°C con agitación durante 3 horas antes de mezclar volúmenes iguales de cultivos de *Agrobacterium* conteniendo los cultivos 35S:p19, 35S:Arath-DGAT1 y tanto 35S:Phyin-d17D o 35S:Mic299-w3D antes de la infiltración en tejido de hoja. Se preparó una sal de ácido araquidónico y se alimentó al tejido de hoja transformado como se describió anteriormente con la toma para análisis de los discos de hoja a las 5 horas y 24 horas luego de la alimentación con sustrato. Las manchas en las hojas infiltrados con la construcción 35S:Phyin-d17D o, separadamente, la construcción 35S:Mic299-w3D, todas demostraron la conversión de ARA (20:4 $\omega$ 6) a EPA, (20:5 $\omega$ 3) con una eficiencia de 37 % y 50 %, respectivamente (Figura 13), indicando que la proteína tenía actividad  $\Delta$ 17-desaturasa.

#### Discusión: Caracterización de la primera $\omega$ 3-desaturasa de microalgas con actividad $\Delta$ 17-desaturasa

La  $\omega$ 3 desaturasa de *Micromonas* RCC299 descrita en este estudio es la primera  $\Delta$ 17 desaturasa de microalgas, es decir similar a plantas, descrita, que tiene actividad sobre un sustrato ácido graso C20 o más largo. No se conoce que las plantas terrestres tengan  $\omega$ 3 desaturasas del tipo desaturasa *front-end*, sino del tipo FAD3. Por lo tanto, fue sorprendente encontrar que una cepa de microalga, que está más relacionada a las plantas que a hongos, poseyera una  $\omega$ 3 desaturasa del tipo de desaturasa *front-end*.

Se consideró probable, basándose en la homología con otras desaturasas, que la desaturasa del hongo

*Phytophthora infestans* usada como un gen control en los experimentos descritos anteriormente fue activa sobre sustratos acil-PC mientras que la desaturasa de *Micromonas* RCC299 fue activa sobre sustratos acil-CoA. Se sabe que otras desaturasas de hongos son activas sobre sustratos acil-PC. Esta conclusión en relación al gen de *Micromonas* fue consistente con su similitud observada al gen de  $\Delta 6$ -desaturasa de la misma cepa (Ejemplo 4). Esta preferencia por sustrato puede ser examinada adicionalmente por medio de estudios de alimentación con sustrato en donde sustratos tales como ARA dados como alimento al tejido transformado estarán inmediatamente disponibles para el conjunto de acil-CoA, pero sólo disponibles para el conjunto de acil-PC sólo luego de la conversión por las aciltransferasas nativas de la planta (por ejemplo *Nicotiana benthamiana*).

El gen de  $\omega 3$  desaturasa de *Micromonas* RCC299 será muy útil en la construcción de vías recombinantes diseñadas para producir EPA y los ácidos grasos corriente abajo DPA y DHA, y otros VLC-PUFA  $\omega 3$  en plantas, en particular debido a su capacidad de convertir sustratos  $\omega 6$  tales como ARA a productos  $\omega 3$ . La actividad sobre sustratos acil-CoA potencia esta utilidad cuando se combina con elongasas tales como  $\Delta 5$ -elongasas que también operan en el conjunto de acil-CoA. Adicionalmente, el perfil de ácidos grasos de cepas de *Micromonas* indicaron que la enzima de *Micromonas* también puede tener la capacidad de convertir ácidos grasos C18  $\omega 6$  tales como GLA o LA a sus equivalentes  $\omega 3$  tales como SDA o ALA, respectivamente. La conversión de GLA a SDA se puede demostrar tanto en células de levaduras o en plantas por alimentación con sustrato como se describió anteriormente para el sustrato ARA, mientras que la conversión de LA a ALA se demuestra mejor en células de levaduras debido a la presencia de  $\Delta 15$  desaturasas endógenas en plantas.

#### Identificación de otras $\omega 3$ -desaturasas

La secuencia genómica de modelos de proteína filtrados de *Micromonas* CCMP1545 producida por el Instituto de Genómica del Departamento de Energía (<http://www.jgi.doe.gov/>) se analizó con el programa BLASTP usando la SEQ ID NO:17 como la secuencia de búsqueda. Este análisis reveló la presencia de un gen en *Micromonas* CCMP1545 (EuGene.0000150179) que tuvo homología con la SEQ ID NO:17. La secuencia del marco de lectura abierto se provee en SEQ ID NO:19 y la secuencia de la proteína se provee en SEQ ID NO:20.

El análisis por BLAST indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa SEQ ID NO:20 tiene homología con FAT-1, FAT-2 y  $\omega 3$  desaturasas. El grado máximo de identidad entre la desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 y otras proteínas en el banco de datos Genbank (BLASTP) fue 59 % a lo largo de la longitud completa con SEQ ID NO:17. Esta desaturasa *front-end* contuvo un dominio conservado similar a  $\Delta 12$ -FADS (dominio conservado cd03507 en NCBI). Las proteínas que contienen ambos de estos dominios son generalmente desaturasas *front-end* requeridas para la síntesis de ácidos grasos, incluyendo la familia  $\omega 3$  desaturasa. Los inventores predicen que esta proteína también funcionará como una  $\omega 3$  desaturasa con actividad  $\Delta 17$ -desaturasa en plantas.

### **Ejemplo 7. Aislamiento y caracterización de otros genes que codifican $\Delta 9$ -elongasa de microalgas**

#### *Aislamiento y caracterización de la $\Delta 9$ -elongasa de *Emiliania huxleyi* CCMP1516*

Los modelos de proteínas filtrados para la secuencia genómica de *Emiliania huxleyi* CCMP1516 producidas por el Instituto de Genómica del Departamento de Energía de Estados Unidos (<http://www.jgi.doe.gov/>) se analizaron con el programa BLASTP usando la secuencia de aminoácidos de número de acceso al Genbank AF390174 como la secuencia de búsqueda. Este análisis reveló la presencia de una proteína predicha en *Emiliania huxleyi* CCMP1516 que tuvo homología con AF390174. La secuencia de la proteína se provee en SEQ ID NO:28 y la secuencia de nucleótidos de la región codificante como SEQ ID NO:27. El análisis por BLASTP indicó que la secuencia de aminoácidos de longitud completa tiene homología con elongasas PUFA. El mayor grado de identidad entre la elongasa de *Emiliania huxleyi* CCMP1516 y otras proteínas (BLASTP) fue 80 % con AF390174. El dominio de familia GNS1/SUR4 conservado (dominio conservado pfam01151 en NCBI) se representó en esta secuencia, que generalmente indicaba que la proteína estaba involucrada en sistemas de elongación de ácidos grasos de cadena larga.

La secuencia de proteína predicha de *Emiliania huxleyi* CCMP1516 se usó para diseñar y sintetizar una secuencia de nucleótidos optimizada para codón que fue la más adecuada para la expresión en plantas dicotiledóneas tal como *Brassica napus* (SEQ ID NO:29). La construcción plasmídica se designó 0835668\_Emihu-d9E\_pMA.

#### *Aislamiento y caracterización de $\Delta 9$ -elongasas de *P. pinguis* y *P. salina**

Para identificar posibles regiones conservadas dentro de las  $\Delta 9$ -elongasas de *P. pinguis* y *P. salina* se llevó a cabo un alineamiento a partir de secuencias de aminoácidos deducidas de elongasa de la  $\Delta 9$ -elongasa de *E. huxleyi*, PLL00000665 (una secuencia EST de *P. lutheri* de TBestDB identificada a partir del análisis por BLAST usando las secuencias de elongasa de *E. huxleyi* como búsqueda) y número de acceso al Genbank AAL37626 ( $\Delta 9$ -elongasa de *I. galbana*). Esto reveló los bloques de secuencia de aminoácidos consenso VDTRKGAYR (SEQ ID NO:76) y FIHTIMYTY (SEQ ID NO:77) correspondiente a las posiciones de aminoácidos 40-48 y 170-178, respectivamente, de Emihu-d9E. Los cebadores degenerados 5'-TGGTGGACACAAGGAAGGGNGCNTAYMG-3' (SEQ ID NO:78) y 5'-GTAGGTGTACATGATGGTRTGDATRAA-3' (SEQ ID NO:79) se sintetizaron basándose en las secuencias de estos

dos bloques y se realizaron amplificaciones por RT-PCR y PCR usando ARN de *P. pinguis* y una biblioteca de ADNc de *P. salina* (Zhou et al., 2007) usando el sistema de RT-PCR Superscript III™ Platinum® One-Step o ADN polimerasa Taq (NEB, Ipswich, MA, EE.UU.).

5 Se generó un amplicón de 641 pares de bases de *P. pinguis* por RT-PCR, se ligó en pGEM-T Easy® y se secuenció. Los cebadores se diseñaron para extender el fragmento de 641 pares de bases por 5'- y 3'-RACE, el extremo 3' del gen se aisló por RT-PCR usando el cebador directo específico de gen 5'-GTCCTTGCTCCAGGGCTCCACCA-3' (SEQ ID NO:80) y un cebador reverso oligo-dT-SP6 5'-ATTTAGTGACTACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:81). Este producto se diluyó 1:10 y se usó 1,0 µl como molde en una segunda ronda de PCR usando ADN polimerasa Taq (NEB) con el cebador directo específico de gen 5'-TTCCAGAACGAGGGCATCTACGT-3' (SEQ ID NO:82) y el mismo cebador reverso. Se generó un amplicón de 1079 pares de bases, se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló a partir de 1,0 µg de ADNc de *P. pinguis* generado con el cebador reverso específico de gen 5'-TTGGGTGATCTGCATGAGCGTGATG-3' (SEQ ID NO:83) y se marcó con A en la cola por medio de la transferasa terminal. Luego se usó este ADNc como molde para una reacción de PCR usando el cebador oligo-dT-SP6 y el cebador específico de gen 5'-CGAATACTTGAAGAGCTTGTGGAGA-3' (SEQ ID NO:84). Este producto se diluyó 1:10 y se usó 1,0 µl como molde en una segunda ronda de PCR usando el cebador oligo-dT-SP6 y el cebador específico de gen 5'-GGGCTACGAGCTGGCAGATGAAGCA-3' (SEQ ID NO:85). Se generó un amplicón de 323 pares de bases, se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció. La secuencia de longitud completa se ensambló a partir de las tres secuencias parciales. Se amplificó la región codificante de longitud completa con una región corta de UTR 5' a partir de ARN total por RT-PCR usando el cebador directo 5'-GAAAAATGGTTGCGCCACCCATCA-3' (SEQ ID NO:86) y el cebador reverso 5'-TCACTACTTCTTCTTCTTGGCCGCGGC-3' (SEQ ID NO:87). Se generó un amplicón de 828 pares de bases, Pavpi-Elo1, y éste se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció (SEQ ID NO:93). La secuencia de aminoácidos deducida de la Δ9-elongasa de *P. pinguis* se provee como SEQ ID NO:94.

25 Similarmente, se generó un amplicón de 425 pares de bases a partir de *P. salina* por PCR usando los cebadores degenerados, se ligó en pGEM-T Easy® y se secuenció. Los cebadores se diseñaron para extender un fragmento de 425 pares de bases por 5'- y 3'-RACE, el extremo 3' del gen se aisló por RT-PCR usando el cebador directo específico de gen 5'-TTCCGGTACTCAGCGGTGGCG-3' (SEQ ID NO:88) y el cebador reverso oligo-dT-SP6. Se generó un amplicón de 776 pares de bases, se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció. El extremo 5' del gen se aisló por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de *P. salina* usando el cebador M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO:89) y un cebador reverso específico de gen 5'-ACGTAGATGCCCTCGTTCTG-3' (SEQ ID NO:90) con la ADN polimerasa Pfu Ultra II® Fusion como lo especifica el fabricante. Se generó un amplicón de 710 pares de bases, se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció. La secuencia de longitud completa se ensambló a partir de las tres secuencias parciales. Se amplificó la región codificante de longitud completa con una región corta de UTR 5' a partir de ARN total por RT-PCR usando el cebador directo 5'-CACCGAATGGCGACTGAAGGGATGCC-3' (SEQ ID NO:91) y el cebador reverso 5'-CTACTCGGTTTTTCATGCGGTTGCTGGA-3' (SEQ ID NO:92). Se generó un amplicón de 846 pares de bases, Pavsa-Elo3, y éste se ligó en pGEM-T® Easy y se secuenció (SEQ ID NO:95). La secuencia de aminoácidos deducida de la elongasa de *P. salina* se provee como SEQ ID NO:96.

#### Caracterización funcional de las Δ9-elongasas en células de plantas

45 Las regiones codificantes completas de la elongasa de *Emiliania* (Emihu-d9E), la elongasa de *Pavlova pinguis* (Pavpi-d9E) y la elongasa de *Pavlova salina* (Pavsa-d9E), contenida entre fragmentos EcoRI, de los plásmidos 0835668\_Emihu-d9E\_pMA, pGEMT+Pavpi-d9E y pGEMT+Pavsa-d9E, respectivamente, se insertaron en 35S-pORE04 en el sitio EcoRI para generar 35S:Emihu-d9E (designada pJP3027), 35S:Pavpi-d9E (designada pJP3103), 35S:Pavsa-d9E (designada pJP3081) y 35S:Isoga-d9E (designada pJP2062). Las actividades enzimáticas de Emihu-d9E, Pavpi-d9E y Pavsa-d9E junto con Isoga-d9E (Qi et al., 2002), usadas en la presente como una muestra de control positivo, se demostró en plantas usando un sistema mejorado de expresión transitorio en *Nicotiana benthamiana* como se describe en el Ejemplo 1.

55 Estos vectores quiméricos se introdujeron en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y las células de cultivos de estos se infiltraron en tejidos de hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* en el vivero. Las plantas se hicieron crecer durante otros cinco días luego de la infiltración antes de tomar discos de hojas para el análisis por GC que reveló por la presencia de los productos de ácidos grasos, que ambos genes fueron funcionales como Δ9-elongasas en células de plantas como *Nicotiana benthamiana*.

60 El tejido de hojas transformado con la Δ9-elongasa de *Emiliania huxleyi* CCMP1516 contuvo 20:2<sup>Δ11,14</sup> (6,6 %) y 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> (6,4 %), que representó eficacias de conversión de LA y ALA del 39,9 % y 12,4 %, respectivamente. El tejido de hojas transformadas con la Δ9-elongasa de *Pavlova pinguis* contuvo 20:2<sup>Δ11,14</sup> (10,1 %) y 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> (6,6 %), que representó eficacias de conversión del 56,0 % y 13,3 %, respectivamente. El tejido de hojas transformadas con la Δ9-elongasa de *Pavlova salina* contuvo 20:2<sup>Δ11,14</sup> (7,7 %) y 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> (4,6 %), que representó eficacias de conversión del 45,0 % y 9,2 %, respectivamente. El tejido de hojas transformadas con la Δ9-elongasa de *Isochrysis galbana* contuvo 20:2<sup>Δ11,14</sup> (9,2 %) y 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> (7,5 %), que representó eficacias de conversión del 48,9 % y 15,4 %, respectivamente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Composición de ácidos grasos (porcentaje de los ácidos grasos totales) de tejido de hoja de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente con  $\Delta 9$ -elongasas. Se muestran las desviaciones estándares entre infiltraciones separadas realizadas por triplicado.

Ácido graso	Control	Emihu- $\Delta 9E$	Pavsa- $\Delta 9E$	Pavpi- $\Delta 9E$	Isoga- $\Delta 9E$
<b>FA usual</b>					
16:0	15,7±0,6	14,6±0,1	15,2±0,6	14,5±0,8	14,2±0
16:1 $\Delta 3t$	1,5±0	1,4±0	1,3±0,1	1,3±0	1,3±0,1
16:3 $\Delta 9,12,15$	6,8±0,7	6,5±0,8	6,1±0,8	6,1±1,4	7,4±0,5
18:0	3,0±0,1	3,4±0,2	4,2±0,2	3,4±0,5	3,1±0,2
18:1 $\Delta 9$	2,2±0	2,9±0,2	3,2±0,2	3,6±0,7	3,2±0,1
18:2 $\Delta 9,12$	11,8±0,4	9,9±0,1	9,4±0,2	7,9±0,5	9,7±0,4
18:3 $\Delta 9,12,15$	56,0±1,4	45,3±2,2	46,0±1,4	43,4±1,8	41,5±1,3
Otros menores	3,0±0	3,0±0	2,3±0	3,1±0	2,9±0
Total	100	87,0	87,7	83,3	83,3
<b>Nuevo PUFA <math>\omega 6</math></b>					
20:2 $\Delta 8,11$	–	6,6±1,0	7,7±0,7	10,1±0,7	9,2±0,8
20:3 $\Delta 8,11,14$	–	–	–	–	–
20:4 $\Delta 5,8,11,14$	–	–	–	–	–
22:4 $\Delta 7,10,13,16$	–	–	–	–	–
22:5 $\Delta 4,7,10,13,16$	–	–	–	–	–
Total	0	6,6	7,7	10,1	9,2
<b>Nuevo PUFA <math>\omega 3</math></b>					
20:3 $\Delta 11,14,17$	–	6,4±1,5	4,6±0,7	6,6±0,4	7,5±0,2
20:4 $\Delta 8,11,14,17$	–	–	–	–	–
20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$	–	–	–	–	–
22:5 $\Delta 7,10,13,16,19$	–	–	–	–	–
22:6 $\Delta 4,7,10,13,16,19$	–	–	–	–	–
Total	0	6,4	4,6	6,6	7,5
Nuevos FA totales	0	13,0	12,3	16,7	16,7
FA totales	100	100	100	100	100

5 La aparentemente elevada preferencia por el sustrato  $\omega 3$  ALA en el tejido de las hojas fue esperada ya que la mayor parte del sustrato ALA en la hoja de *N. benthamiana* está localizado en el plástido y por lo tanto no disponible para una elongación extra plástido y debido a que el ALA del plástido y del citoplasma se aíslan de la hoja durante la metilación directa, la tasa de conversión  $\omega 3$  se reduce artificialmente. Las  $\Delta 9$ -elongasas de *E. huxleyi* y *I. galbana* mostraron idénticas preferencias por sustrato en *N. benthamiana* con tasas de conversión de  $\omega 3$  a  $\omega 6$  de 0,31. La conversión más eficaz en el conjunto de  $\omega 6$  se vio con la  $\Delta 9$ -elongasa de *P. salina* con 56,0 % del sustrato siendo convertido. Por el contrario, 13,3 % del sustrato  $\omega 3$  se convirtió, una tasa de 0,24. La enzima de *P. pinguis* mostró la mayor preferencia por sustratos  $\omega 6$  con una tasa de conversión de 0,20 resultando de 45,0 % de conversión  $\omega 6$  pero sólo 9,2 % de conversión  $\omega 3$ .

15 **Ejemplo 8. Construcción de una vía biosintética que incluye  $\Delta 9$  elongasa para producir ARA**

Construcción de una vía delta-9 elongasa transgénica

20 Se construyó un vector binario conteniendo la  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana* (secuencia de aminoácidos con número de acceso al GenBank AF390174 - marco de lectura abierto provisto como SEQ ID NO:21, secuencia de aminoácidos como SEQ ID NO:22),  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina* (número de acceso ABL96296 - marco de lectura abierto provisto como SEQ ID NO:23, secuencia de aminoácidos como SEQ ID NO:24) y  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (número de acceso ABL96295 - marco de lectura abierto provisto como SEQ ID NO:25, secuencia de aminoácidos como SEQ ID NO:26) a partir del vector binario pJP101acq. El diseño de este vector sin los insertos de

gen se muestra esquemáticamente en la Figura 14.

Primero, el fragmento *SmaI-EcoRV* de un clon pBluescript conteniendo la  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana* se ligó en el sitio *SmaI* de pJP101acq para producir pJP105. El fragmento *XhoI* de un clon pBluescript conteniendo la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* se ligó en el sitio *XhoI* de pJP105 para producir pJP106. El fragmento *NotI* de un clon pBluescript conteniendo la  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina* se ligó en el sitio *NotI* de pJP106 para producir pJP107, que se muestra esquemáticamente en la Figura 15.

Muchos puntos son remarcables sobre el diseño. En primer lugar, dos de los tres genes se transcribieron en forma divergente sobre el T-ADN, es decir separado uno del otro. Esto se realizó para prevenir la transcripción de cualquier gen estando dirigido directo, e interfiriendo potencialmente con la expresión del otro gen y de este modo maximizar la expresión de ambos. En segundo lugar, el tercer gen en la construcción genética, en este caso que codifica la  $\Delta 8$ -desaturasa, se separó del segundo gen orientado en la misma dirección, que codifica la  $\Delta 9$ -elongasa, por la inserción de un espaciador. Se pensó que una distancia de al menos 1,0kb entre el codón de finalización del gen corriente arriba y el codón de inicio del gen corriente abajo podría reducir el riesgo de transcripción del primero interfiriendo con el último, o potencialmente causando el silenciamiento del gen. En tercer lugar, la UTR 5' de cada uno de los tres genes se modificó para incluir una secuencia líder TMV que se sabe que provee una traducción eficaz. Se podría haber usado cualquier otra secuencia UTR 5' que se sepa que confiere alta eficacia de traducción en lugar de la secuencia TMV.

Se introdujo pJP107 en la cepa AGLI de *Agrobacterium* por electroporación y la cepa transformada se usó para introducir la construcción genética en *Arabidopsis thaliana*, ecotipo MC49, que era un mutante *fad3/fae1* con altos niveles de LA como potencial ácido graso sustrato inicial para la  $\Delta 8$ -desaturasa. La transformación en planta y análisis se realizó usando el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Las semillas (semillas T1) de las plantas tratadas (plantas T0) se sembraron sobre medio selectivo con higromicina (20 mg/l) y se seleccionaron las plantas transformadas y se transfirieron a suelo para establecer 24 plantas T1 transgénicas confirmadas. Se esperó que la mayoría de estas plantas T1 fueran heterocigóticas para la construcción genética introducida. Las semillas T2 de las 24 plantas transgénicas se recolectaron en madurez y se analizó la composición de ácidos grasos. Estas líneas T2 incluyeron líneas que fueron homocigotas para la construcción genética, así como algunas fueron heterocigóticas. Se establecieron plantas T2 a partir de las semillas T2 para las 6 líneas conteniendo los niveles más elevados de ARA, usando selección en medio MS conteniendo higromicina (20 mg/ml) para determinar la presencia de los transgenes. Por ejemplo, las semillas T2 plantadas a partir de la planta T1 se designaron FW-10, conteniendo 5,8 % de ARA y mostrando una relación de segregación 3:1 de progenie resistente a susceptible en medio higromicina, indicando que FW-10 contenían la construcción genética en un único locus genético. Se analizaron los perfiles de ácidos grasos de los lotes de semillas T3 de FW-10 y los datos se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Composición de ácidos grasos de semillas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción genética pJP107 conteniendo los genes de  $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana*,  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina* y  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina*.

	<b>FW10-23</b>	<b>Control MC49</b>
<b>Muestra</b>	<b>P1235</b>	<b>P1254</b>
14:0	0,0	0,1
16:1 $\omega 7$	0,6	0,4
16:0	9,5	8,4
18:2 $\omega 6$	30,9	50,9
18:3 $\omega 3$	0,0	1,0
18:1 $\omega 9$	21,4	30,9
18:1 $\omega 7$	3,3	3,5
18:0	4,3	3,4
20:4 $\omega 6$	21,0	0,0
20:5 $\omega 3$	1,3	0,0
20:3 $\omega 6$	1,1	0,0
20:4 $\omega 3^*$	0,2	0,0
20:2 $\omega 6$	2,6	0,0
20:3 $\omega 3$	0,2	0,0
20:1 $\omega 9/\omega 1$	1,6	0,2
20:0	0,7	0,5
22:4 $\omega 6$	0,8	0,0
22:5 $\omega 3$	0,0	0,0
22:0	0,0	0,2
24:1 $\omega 11/13$	0,2	0,1

24:0	0,2	0,2
Suma	100	100
Suma de PUFA $\omega$ 6	56	51
% conversiones		
$\Delta$ 9E		
LA $\rightarrow$ 20:2 $\omega$ 6	45	0
ALA $\rightarrow$ 20:3 $\omega$ 3	100	0
$\Delta$ 8D		
20:2 $\omega$ 6 $\rightarrow$ 20:3 $\omega$ 6	90	0
20:3 $\omega$ 3 $\rightarrow$ 20:4 $\omega$ 3	88	0
$\Delta$ 5D		
20:3 $\omega$ 6 $\rightarrow$ 20:4 $\omega$ 6	95	0
20:4 $\omega$ 3 $\rightarrow$ 20:5 $\omega$ 3	90	0

Tal como se resume en la Tabla 10, las semillas no transformadas de *Arabidopsis* (ecotipo MC49) contuvieron cantidades significativas del sustrato  $\omega$ 6 precursor LA pero no contuvieron nada de ARA o los ácidos grasos intermediarios esperados que ocurrieran en la vía de la  $\Delta$ 9 elongasa. Por el contrario, las semillas de plantas FW10-23 transformadas conteniendo la construcción pJP107 contuvieron niveles significativos de 20:2n-6, 20:3n-6 y 20:4n-6 (ARA), incluyendo 21 % de ARA, el producto de los tres pasos enzimáticos que comienzan con LA. Adicionalmente, el bajo nivel de ALA en el aceite de semillas (1,0 % en control MC49) se convirtió muy eficazmente a EPA, que estaba presente en un nivel de 1,3 % en la línea transformada FW10-23.

#### 10 *Discusión: Eficacias de conversión e implicancias bioquímicas*

Las eficacias relativas de los pasos enzimáticos individuales codificados por la construcción pJP107 podrían ser evaluados por el examen de la conversión porcentual de ácido graso sustrato a productos ácidos grasos (incluyendo los posteriores derivados) en FW-10-23. En el conjunto de  $\omega$ 6, la  $\Delta$ 9 elongasa de *Isochrysis galbana* mostró 45 % de conversión de LA a EDA y posteriormente ácidos grasos desaturados. En la misma semilla, la  $\Delta$ 8-desaturasa y  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pavlova salina* mostró una eficacia de conversión de 90 % y 95 %, respectivamente de los ácidos grasos  $\omega$ 6 a sus productos importantes. En comparación, en el conjunto de  $\omega$ 3, la  $\Delta$ 9 elongasa de *Isochrysis galbana* mostró esencialmente una conversión del 100 % de ALA a productos elongados, mientras que la  $\Delta$ 8-desaturasa y  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pavlova salina* mostraron eficacias de conversión del 88 % y 90 %, respectivamente. Estos pasos enzimáticos dieron como resultados la síntesis de 1,3 % de EPA, a pesar que la *Arabidopsis thaliana* MC49 precedente contiene sólo bajos niveles de ALA. En el resultado más sorprendente, se advirtió que no se detectó ALA en el aceite de semilla, lo que indica esencialmente una conversión de 100 % de ALA a productos elongados de ALA a través de la  $\Delta$ 9 elongasa.

Es interesante notar que los niveles de ácidos grasos intermediarios inusuales que se encuentran en FW-10-23 fueron bajos (<0,4 % en el grupo  $\omega$ 3) y comparables con aquellos ya encontrados en la cadena alimentaria de diferentes pescados y mariscos (Tabla 11). Incluso aunque el aceite de semilla de MC49 sin transformar contenía solo niveles bajos de ALA y que esto pueda haber contribuido a los bajos niveles observados de, por ejemplo, el ácido graso intermediario ETrA, se predice que cuando la misma ruta metabólica se ensambla sobre un fondo genético que tiene mayores niveles de ALA, el aceite de semilla resultante aun tendría niveles relativamente bajos (<3 %) de ETrA. La presencia de dichos bajos niveles de estos intermediarios probablemente fue debida a la desaturación muy eficiente de los intermediarios  $\Delta$ 9 elongados.

**Tabla 11.** Comparación de los ácidos grasos en semillas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción genética pJP107 que contiene los genes de  $\Delta$ 9-elongasa de *Isochrysis galbana*,  $\Delta$ 8-desaturasa de *Pavlova salina* y  $\Delta$ 5-desaturasa de *Pavlova salina* y los ácidos grasos intermediarios hallados en un rango de muestras de pescados y mariscos.

	<b>P1235</b>	<b>Pescado o marisco</b>	
<b>Muestra</b>		<b>Promedio</b>	<b>rango - máximo</b>
14:0	0,0	1,7	31,1
16:1 $\omega$ 7	0,6	2,9	8,2
16:0	9,5	18,7	53,6
18:2 $\omega$ 6	30,9	1,9	14,6

18:3 $\omega$ 3*	0,0	0	0
18:1 $\omega$ 9	21,4	13,9	59,5
18:1 $\omega$ 7	3,3	3	7,9
18:0	4,3	8,5	14,7
20:4 $\omega$ 6	21,0	6,7	19,1
20:5 $\omega$ 3	1,3	7,1	22,2
20:3 $\omega$ 6	1,1	0,3	1,5
20:4 $\omega$ 3	0,2	0,5	2,8
20:2 $\omega$ 6	2,6	0,4	1,8
20:3 $\omega$ 3*	0,2	0	0
20:1 $\omega$ 9/ $\omega$ 11	1,6	2,2	21,1
20:0	0,7	0,4	4,2
22:4 $\omega$ 6	0,8	1	4,4
22:5 $\omega$ 3	0,0	2,4	14,9
22:0	0,0	0,2	0,7
24:1 $\omega$ 9/11/13*	0,2	0	0
24:0	0,2	0,2	1,6
Suma de PUFA $\omega$ 6	56	10	41
% de conversiones			
$\Delta$ 9E			
LA-->20:2 $\omega$ 6	45	82	
ALA-->20:3 $\omega$ 3	100	100	
$\Delta$ 8D			
20:2 $\omega$ 6-->20:3 $\omega$ 6	90	95	
20:3 $\omega$ 3-->20:4 $\omega$ 3	88	100	
$\Delta$ 5D			
20:3 $\omega$ 6-->20:4 $\omega$ 6	95	96	
20:4 $\omega$ 3-->20:5 $\omega$ 3	90	95	

Vale la pena señalar que la  $\Delta$ 8-desaturasa de *Pavlova salina* fue considerablemente más eficiente en la conversión de ETrA a ETA en comparación con las otras  $\Delta$ 8-desaturasas publicadas, en particular cuando se coexpresa con  $\Delta$ 9 elongasa y  $\Delta$ 5 desaturasa. Por ejemplo, se ha informado que cuando la  $\Delta$ 8-desaturasa de *Euglena gracilis* se coexpresó o bien con la  $\Delta$ 9-elongasa de *Euglena gracilis* o bien con la de *Isochrysis galbana* en embriones de soja, las eficiencias de conversión de sustratos  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 fueron 64 % y 73 %, respectivamente. La eficiencia de cada paso observada en el experimento que se describió previamente y la eficiencia de conversión total de ALA a EPA fue también mucho mayor que la informada por Qi et al. (2004) en hojas de *Arabidopsis*, en donde los mismos observaron solo 3,0 % de EPA y niveles sustanciales de intermediarios indeseables que incluyen ETrA (4,6 %).

Las elongasas se sabe que solo tienen acceso a sustratos en el conjunto de los acil-CoA. El hecho de que los subsiguientes pasos de la  $\Delta$ 8-desaturasa y la  $\Delta$ 5-desaturasa se hayan observado como funcionando con eficiencias extremadamente altas en las semillas transformadas, aun cuando el producto  $\Delta$ 9-elongado fue indudablemente producido en el conjunto de los acil-CoA, fue una fuerte indicación de que ambas desaturasas de *Pavlova salina* eran capaces de acceder a sustratos acil-CoA con altas eficiencias.

#### Biosíntesis de altos niveles de ARA y EPA usando la ruta metabólica de $\Delta$ 9-elongasa

A partir de estos datos y las observaciones de la eficiencia de los pasos individuales, se predijo que sería posible generar altos niveles de ARA y EPA y subsiguientemente de DPA y DHA en una planta transgénica tal como *Arabidopsis*, canola, soja, lino o algodón usando una ruta metabólica de  $\Delta$ 9-elongasa modificada. Además se predijo que se pueden hacer niveles incluso más altos con agregado adicional de cualquiera de las tres funciones enzimáticas, o sea con la función acil-CoA  $\Delta$ 12-desaturasa, para incrementar la cantidad de sustrato LA disponible en el conjunto de los acil-CoA para la  $\Delta$ 9-elongación, segundo con el agregado de una  $\Delta$ 15-desaturasa para incrementar el nivel de ALA para la conversión directa a EPA, y tercero con una  $\Delta$ 17-desaturasa que puede convertir

ARA a EPA tal como la que se describe en el Ejemplo 6. Más preferentemente, el agregado de una acil-CoA  $\Delta 12$ -desaturasa ya sea con la  $\Delta 15$ -desaturasa o bien con la  $\Delta 17$ -desaturasa, proveerá niveles máximos. Por lo tanto, el uso de enzimas capaces de tener acceso a sustratos dentro del conjunto de los acil-CoA se espera que resulte en una conversión más eficiente a EPA, DHA y DHA.

La síntesis observada de 1,3 % de EPA fue destacada e inesperada considerando que el fondo de *Arabidopsis thaliana* MC49 contenía una mutación *fad3* que resultó en menores niveles de acumulación de ALA (entre 1 y 3 %). Los inventores predijeron que cuando se transforman esta, o similares rutas metabólicas de  $\Delta 9$ -elongasa ( $\Delta 9$ -elongasa,  $\Delta 8$ -desaturasa y  $\Delta 5$ -desaturasa) en una planta que contiene altos niveles de ALA, resultarán niveles de EPA altos. Por ejemplo, los inventores predicen que la transformación de esta ruta metabólica en una línea de *Arabidopsis* que expresa en exceso la  $\Delta 15$ -desaturasa de *Perilla frutescens*, u otros genes  $\Delta 15$ -desaturasa, resultará en niveles de EPA de al menos 25 % de los ácidos grasos totales en el aceite de semilla.

### **Ejemplo 9. Expresión de genes para la ruta metabólica de PUFA en células vegetales**

Una alternativa a la transformación estable de plantas es la expresión transitoria de transgenes en hojas, tal como la primera introducida por Kapila et al (1997). Con esta técnica, se transforman núcleos de células de hojas competentes (Zipfel et al., 2006) a través de infiltración de los espacios aéreos abaxiales con cultivos de *Agrobacterium* que portan construcciones de expresión dentro de los bordes del ADN T. La expresión de los transgenes en las hojas se potencia significativamente mediante la introducción conjunta de proteínas supresoras víricas, tales como P19 (Voinnet et al., 2003) y HC-Pro (Johansen y Carrington, 2001; Kasschau et al., 2003), que inhiben el aparato de silenciamiento de transgenes de las células hospedadoras y extienden la expresión del transgén durante un periodo de tiempo más largo.

Las hojas tienen un metabolismo lipídico complejo que está dominado por los grandes conjuntos de galactolípidos monogalactosildiacilgliceroles (MGDG) y digalactosildiacilgliceroles (DGDG) de los plástidos. Por fuera de los compartimentos plastídicos existen otros conjuntos menores de ácidos grasos que incluyen a aquellos esterificados a fosfatidilcolina (PC), coenzima A (CoA) y mono- y diacilglicéridos (MAG, DAG; Ohlrogge y Browse, 1995). Las enzimas de síntesis de LC-PUFA que se usan en este Ejemplo residen en el retículo plasmático (RE; Napier, 2007) en donde las mismas tienen acceso a los conjuntos de lípidos de hojas relativamente minoritarios esterificados a PC y CoA. Los productos metabólicos de las reacciones ligadas a PC-CoA, tales como las que son activas sobre el RE, se pueden acumular en los triacilglicéridos (TAG) mediante la sobreexpresión de una diacilglicérido-O-aciltransferasa (DGAT; Bouvier-Nave et al., 2000). En comparación con los MAG o los DAG, los ácidos grasos que residen en los TAG son metabólicamente más inertes y son menos propensos a entrar nuevamente a las rutas metabólicas de biosíntesis de lípidos o de ser transportados dentro de los plásmidos. Importantemente, los TAG se pueden separar fácilmente de las clases de lípidos más abundantes que residen en los plástidos de las hojas usando técnicas de cromatografía en capa fina (TLC) estándares. Por lo tanto, una combinación de una mayor acumulación de TAG y una purificación de TAG/clases de lípidos podría ser útil para un entendimiento más completo de las reacciones enzimáticas para LC-PUFA que ocurren en el RE de la hoja.

Este sistema se ensayó para la producción de LC-PUFA usando genes que codifican desaturasas y elongasas en este Ejemplo.

#### *Construcciones de plásmidos para expresión transitoria*

Se prepararon vectores binarios mediante clonación de la región codificante del gen en una versión modificada del vector binario pORE04 descrito por Coutu et al (2007) en el que se había clonado el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en el sitio *SfoI* para dar el 35S-pORE04. Se amplificó la región codificante del gen de  $\Delta 9$ -elongasa de *I. galbana* (acceso a Genbank AAL37626) (SEQ ID NO:21) a partir de ADN genómico y se clonó en el 35S-pORE04 en el sitio *EcoRI*. Se clonaron versiones optimizadas por codón para su expresión en plantas de las tres desaturasas de *P. salina* (accesos a Genbank ABL96296, ABL96295 y AAY15136 – cada una descrita en WO 2005/103253) entre los sitios *EcoRV-SmaI* de 35S-pORE04 como insertos *SmaI*. Se clonó la  $\Delta 5$ -elongasa de *P. salina* no optimizada (acceso a Genbank AAY15135) como fragmento *XhoI-XbaI* en 35S-pORE04 en los sitios *XhoI-NheI*. Una versión del supresor vírico P19 dirigida por 35S de CaMV 35S fue gentilmente donada por el Dr. Peter Waterhouse. La región codificante del gen DAGT1 de *A. thaliana* (acceso a Genbank AAF19262) (SEQ ID NO:74) se obtuvo mediante RT-PCR y se clonó como un fragmento *BamHI-EcoRV* en los correspondientes sitios de 35S-pORE04. Se aisló el ARN total de *Phytophthora infestans* usando un mini conjunto de componentes RNeasy (QIAGEN) y se llevó a cabo la RT-PCR con Platinum Superscript III One-Step (QIAGEN). El amplicón resultante, que contuvo la región codificante de la proteína  $\Delta 17$ -desaturasa de *P. infestans* (WO 2005/012316) se clonó en el pGEMT-Easy (Promega) y se secuenció. Luego se clonó el fragmento *EcoRI* en el 35S-pORE04.

#### *Infiltraciones con Agrobacteria y Condiciones de Crecimiento de N. benthamiana*

La cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* portando cada vector binario se hizo crecer a 28°C en caldo LB suplementado con los antibióticos apropiados. Se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron suavemente en dos volúmenes de solución amortiguadora de infiltración (MES 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, pH 5,7, acetosiringona 100  $\mu$ M) y se

hicieron crecer durante otras 3 horas. Se midieron las densidades ópticas de cada cultivo y se preparó una combinación final de cultivos de modo que cada construcción de *Agrobacterium* iguale una OD<sub>600nm</sub> de 0,2, o como se indica de otra forma en la Figura 16. Se infiltraron las células, como se describe en Voinnet et al. (2003), en el lado inferior de las hojas de plantas de *N. benthamiana* de un mes de edad que se habían alojado en una sala para crecimiento de plantas a 23°C con ciclo de luz: oscuridad de 10:14. Las áreas infiltradas se marcaron con un círculo mediante un marcador permanente. Luego de la infiltración, se dejaron las plantas a 28°C durante una hora, luego de lo cual se transfirieron a una sala para crecimiento de plantas a 24°C hasta su análisis. A menos que se indique de otra manera, todas las agroinfiltraciones de *N. benthamiana* se llevaron a cabo en presencia de una construcción binaria separada que contiene la proteína supresora vírico P19.

#### 10 *Análisis de lípidos*

Se analizaron los perfiles de ácidos grasos de tejidos de hojas, o de las muestras de clases de lípidos de este Ejemplo mediante GC y GC-MS luego de la transesterificación usando una solución de metanol/ HCl/ diclorometano (DCM; 10/1/1 en volumen) a 80°C durante 2 horas para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Los FAME se extrajeron en hexano:DCM (4:1, v/v) y se reconstituyeron en DCM antes de su análisis mediante GC y GC-MS.

Para el análisis de las clases de lípidos, se extrajeron los lípidos totales dos veces desde aproximadamente 50 mg de peso fresco de tejido de hoja infiltrada usando el método descrito por Bligh y Dyer (1959). Los lípidos neutros se purificaron mediante TLC en placas pre-recubiertas con gel de sílice (Silica gel 60, Merck) con hexano/ dietiléter/ ácido acético (70/30/1 en volumen), mientras que los lípidos polares se fraccionaron usando TLC de dos dimensiones, cloroformo/ metanol/ agua (65/25/4 en volumen) para la primera dirección y cloroformo/ metanol/ NH<sub>4</sub>OH/ etilpropilamina (130/70/10/1 en volumen) para la segunda dirección (Khozin et al., 1997). Las manchas de lípidos se visualizaron mediante vapor de yodo, se colectaron en viales y se transestilaron para producir FAME para análisis por GC como se describió previamente. Los TAG se cuantificaron basándose en la cantidad total de ácidos grasos presentes, los que se estimaron mediante análisis por GC como se mencionó previamente y de acuerdo a una cantidad conocida de estándares externos inyectados para cada ácido graso.

Se llevó a cabo la GC usando un Agilent Technologies 6890N GC (Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con una columna capilar de sílice fundida no polar Equity<sup>TM</sup>-1 (15 m x 0,1 mm de diámetro interno, 0,1 µm de espesor de película), un FID, un inyector con opción ranura/sin ranura y un automuestrador e inyector Agilent Technologies 7683 Series que usa helio como gas transportador. Las muestras se inyectaron en modo sin ranura a una temperatura de horno de 120°C y luego de la inyección se elevó la temperatura del horno de 201°C a 10°C minutos<sup>-1</sup> y finalmente a 270°C y se mantuvo durante 20 minutos. Se cuantificaron los picos con el programa Agilent Technologies ChemStation (Rev B.03.01 (317), Palo Alto, California, EE.UU.). Las respuestas de pico fueron similares para los ácidos grasos de estándares auténticos Nu-Check GLC 411 (Nu-Check Prep Inc, MN, EE.UU.) que contienen proporciones iguales de 31 ésteres metílicos de ácidos grasos diferentes, en el rango entre octanoato y DHA, y varios otros LC-PUFAs. Las pequeñas variaciones de respuestas de pico entre los picos se balancearon mediante la multiplicación de las áreas de los picos por factores de normalización de cada pico. Se calculó la proporción de cada ácido graso en el total de ácidos grasos basándose en las áreas de pico individual y total de los ácidos grasos.

Se hizo una GC-MS para confirmar la identidad de todos los nuevos ácidos grasos formados y la misma se llevó a cabo en un Finnigan GCQ Plus GC-MS con atrapador de iones ajustado con inyección sobre columna, configurado a 45°C. Las muestras se inyectaron usando un automuestrador AS2000 sobre una cavidad de retención conectada a una columna no polar HP-5 Ultra de dos fases unidas (50 m x 0,32 mm de diámetro interno x 0,17 µm de espesor de película). La temperatura inicial de 45°C se mantuvo durante 1 minuto, seguido por un programa de incremento de temperatura de 30°C minutos<sup>-1</sup> hasta 140°C, luego a 3°C minutos<sup>-1</sup> hasta 310°C, en donde se mantuvo durante 12 minutos. Se usó helio como gas transportador. Las condiciones de operación del espectrómetro de masa fueron: energía de impacto electrónico 70 eV; corriente de emisión 250 µamp, línea de transferencia a 310°C; temperatura de fuente 240°C; tasa de barrido 0,8 barridos s<sup>-1</sup> y rango de masa entre 40 y 650 Dalton. Los espectros de masa se adquirieron y procesaron con el programa Xcalibur<sup>TM</sup>.

#### 55 *Modificación del perfil de ácidos grasos de N. benthamiana con una elongasa de ácidos grasos expresada en forma transitoria*

Para estimar la concentración de *Agrobacterium* que se requiere para generar una máxima producción de una enzima transgénica funcional, se expresó un gen que codifica la Δ9-elongasa de *Isochrysis galbana* (*IgΔ9elo*; Qi et al., 2002), que se sabe que actúa sobre los sustratos ácido linoleico (LA) y ALA unidos a CoA, que se sabe que son abundantes en las hojas de *N. benthamiana*. Luego de la transferencia de este gen dentro del vector binario corriente abajo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), se agroinfiltró esta construcción en hojas de *N. benthamiana* en presencia de la proteína de supresión vírico P19 para suprimir el silenciamiento del transgén mediado por el huésped, y se determinó el nivel de Δ9-elongación. Los productos de elongación de LA y ALA, EDA y ETrA, respectivamente, se detectaron con una actividad génica casi máxima obtenida con cultivos de *Agrobacterium* con una OD<sub>600</sub> = 0,2 (Figura 16). Fue interesante notar, sin embargo, que las agroinfiltraciones de concentraciones algo diluidas del cultivo (tan bajas como de OD<sub>600</sub> = 0,05) también resultaron en niveles fácilmente

detectables de actividad enzimática.

#### *Efecto de expresión transitoria de DGAT sobre la acumulación de triacilgliceroles*

5 Luego se investigó si se podía incrementar el tamaño del conjunto de TAG en hojas de *N. benthamiana* para proveer un mayor sumidero en donde capturar los productos de las enzimas biosintéticas de ácidos grasos introducidas que actúan en el RE. Se ensayó una construcción que contiene el gen de DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (AtDGAT1) que cataliza el último paso de la biosíntesis de TAG a través de la ruta metabólica de Kennedy como una posible forma de incrementar el conjunto de TAG en las hojas, debido a que las hojas producen naturalmente solo bajos niveles de TAG. Se introdujo la construcción en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración como se describió previamente. Para ensayar la presencia de TAG, se sumergieron segmentos de hojas infiltradas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tamaño en un pequeño disco de Petri con Nile Blue acuoso al 1 % (BDH, Poole, R.U.), se infiltraron por vacío durante 3 minutos, se lavaron brevemente con agua, se incubaron en ácido acético al 1 % durante 3 minutos, y se montaron en agua para su observación. Se colectó la emisión de fluorescencia entre 570 y 10 670 nm usando una excitación a 488 nm en un microscopio confocal de barrido laser Leica SP2 (Leica Microsystems, Sídney, Australia). Como controles se usaron sectores no transformados de las mismas hojas. Las cantidades relativas de acumulación de TAG en cada ensayo se estimaron usando el programa de computación ImageJ.

20 La expresión transitoria de la DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (AtDGAT1) resultó en la producción de significativamente más cuerpos lipídicos que se tiñeron con Nile Blue y se observaron usando microscopía confocal. El incremento de TAG se cuantificó mediante fraccionamiento de los lípidos totales en TAG, usando separación por TLC de fase neutra de las otras clases de lípidos de hoja, luego de lo cual se midió la cantidad de TAG como la cantidad de ácidos grasos totales en la fracción TAG. La expresión transitoria de P19 o P19 y AtDGAT1 en conjunto 25 resultó en un incremento de TAG de 46 µg.g<sup>-1</sup> de peso fresco a 206 µg.g<sup>-1</sup> de peso fresco, respectivamente, lo que muestra que el agregado del gen de DGAT1 incrementó los niveles de TAG, que se acumularon en el tejido de la hoja. Por lo tanto, se incluyó este gen en los subsiguientes experimentos a menos que se indique de otra manera.

#### *Disponibilidad de sustratos de ácidos grasos exógenos para los genes expresados en forma transitoria*

30 Luego se examinó si se podía proveer a la hoja de un sustrato de ácido graso exógeno que no era natural de *N. benthamiana* y hacerlo disponible para la conversión mediada por los transgenes, permitiendo de ese modo ensayar pasos enzimáticos individuales en forma aislada. Para probar esto, se agroinfiltró el gen que codifica la Δ17-desaturasa de *Phytophthora infestans* (PiΔ17des) que actúa sobre ARA, un sustrato no natural presente en *N. benthamiana*, para producir EPA. Cuatro días luego de la infiltración con PiΔ17des, se le administró a la hoja ARA-sal de amonio mediante inyección en una forma similar a la llevada a cabo para transformar la hoja con cultivos de *Agrobacterium*. Luego se dejó que la hoja metabolice el sustrato durante cuatro horas antes de extraer los lípidos 35 totales del tejido de la hoja. El análisis por GC y GC-MS de estos lípidos totales mostró que el 37 % del ARA administrado en forma exógena se convirtió, mediante la Δ17-desaturación, a EPA, una eficiencia comparable a la informada para ensayos basándose en levaduras (WO 2005/012316).

#### *Ensamblaje rápido de rutas metabólicas de LC-PUFA de cinco pasos a partir de vectores binarios separados*

45 Habiendo establecido que el sistema de *N. benthamiana* era una herramienta útil para la determinación de la función de un transgén individual y la acumulación aumentada de TAG, se investigó la extensión en la que se podría utilizar el sistema para ensamblar rutas metabólicas completas de LC-PUFA. En este estudio, se probaron genes que codifican cinco enzimas metabólicas de LC-PUFA, que producen dos rutas metabólicas lineales paralelas de LC-PUFA, o sea la ruta metabólica de ω6, que convierte LA a DPA<sup>ω6</sup>, y la ruta metabólica de ω3, que convierte ALA a DHA (Figura 1). Los genes biosintéticos que se usaron fueron Δ9-elongasa de *Isochrysis galbana* (IgΔ9elo), Δ8-desaturasa de *Pavlova salina* (PsΔ8des), Δ5-desaturasa de *P. salina* (PsΔ5des), Δ5-elongasa de *P. salina* (PsΔ5elo) 50 y Δ4-desaturasa de *P. salina* (PsΔ4des; Qi et al., 2004; Robert et al., 2009; Zhou et al., 2007). Cada gen se clonó en forma separada en un vector binario de expresión vegetal corriente abajo del promotor 35S de CaMV como se describió previamente y se agroinfiltró una mezcla de estas construcciones, cada una presente a una concentración de una OD<sub>600nm</sub> = 0,2, en las superficies abaxiales de hojas de *N. benthamiana* junto con AtDGAT1 y P19, haciendo un total de siete construcciones individuales con un total de OD<sub>600nm</sub> = 1,4.

60 Cinco días luego de la infiltración se tomaron muestras de discos de hojas y se produjeron ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) directamente a partir del tejido fresco, y se analizaron e identificaron mediante GC/MS (Tabla 12). Fue claro que todas las enzimas de la ruta metabólica fueron capaces de aceptar ya sea los PUFA ω6 o los ω3 como sustratos, y su acción sucesiva sobre LA o ALA, condujo a la síntesis de los LC-PUFA, ARA y DHA, respectivamente. Se identificó un porcentaje total de LC-PUFA producidos como nuevos de 16,9 %, incluyendo 9,8 % de LC-PUFA ω6 y 7,1 % de LC-PUFA ω3. De todos estos formados *de novo*, ARA, EPA y DHA se consideran 65 nutricionalmente importantes y constituyen 3,6 %, 2,6 % y 1,1 %, respectivamente, de los ácidos grasos totales en los tejidos de hojas. Se calcularon las eficiencias de conversión enzimática para cada paso de las rutas metabólicas de ω6 y ω3 y se compararon con las de estudios previos (Figura 17). Los primeros tres pasos tanto de la ruta metabólica de cinco pasos de ω6 como de ω3 fueron similares en eficiencia en comparación con los descritos por Qi

et al. (Qi et al., 2004), mientras que las eficiencias de los últimos dos pasos de las rutas metabólicas fueron las mismas que las usadas por Robert et al. (Robert et al., 2005). Esta comparación de genes expresados en forma transitoria y genes expresados en forma estable indicó que ambos métodos de introducción de las rutas metabólicas generan flujos o eficiencias metabólicas similares. Estas eficiencias de conversión calculadas sobre los perfiles de ácidos grasos totales probablemente estén subestimadas, en especial para el primer paso, una  $\Delta 9$ -elongación, debido al efecto de dilución de los grandes conjuntos de LA y ALA en el plástido. Este punto se solucionó mediante el fraccionamiento de las clases de lípidos como sigue.

**Tabla 12.** Perfiles de ácidos grasos de secciones de hojas de *N. benthamiana* que producen tanto LC-PUFA  $\omega 6$  como  $\omega 3$ . Cada infiltración contuvo una mezcla de cultivos de *Agrobacterium* con construcciones de expresión ectópica del supresor vírico P19 aislado a partir del virus del enanismo ramificado del tomate y la diacilglicerol O-aciltransferasa de *Arabidopsis thaliana* (AtDGAT1). Las infiltraciones de ruta metabólica de LC-PUFA incluyen cinco genes extra, que son,  $\Delta 9$  elongasa de *Isochrysis galbana* (Ig $\Delta 9$ elo),  $\Delta 8$ -desaturasa de *Pavlova salina* (Ps $\Delta 8$ des),  $\Delta 5$ -desaturasa de *P. salina* (Ps $\Delta 5$ des),  $\Delta 5$ -elongasa de *P. salina* (Ps $\Delta 5$ elo) y  $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina* (Ps $\Delta 4$ des).

Para una mayor claridad, no se incluyeron los ácidos grasos saturados y minoritarios en la tabla, pero se los usó para el cálculo de los porcentajes. (-) indica cantidades no detectables de ácido graso. Los datos están generados a partir de 3 réplicas y se muestran los errores estándares.

Ácido Graso	FAME Totales (%)	
	Control	5 genes para LC-PUFA
16:0	15,9±0,2	20,1±0,9
16:1 <sup><math>\Delta 3t</math></sup>	1,7±0,1	1,5±0,2
16:3 <sup><math>\Delta 9,12,15</math></sup>	6,3±0,3	5,2±0,3
18:0	3,6±0,3	3,7±0,2
18:1 <sup><math>\Delta 9</math></sup>	2,8±0,1	3,1±0,7
18:2 <sup><math>\Delta 9,12</math></sup> (LA)	18,6±0,1	8,0±0,7
18:3 <sup><math>\Delta 9,12,15</math></sup> (ALA)	45,5±1,4	38,0±1,9
20:0	1,3±0,4	0,8±0
Otros minoritarios	4,1	2,6
Total	100	83,1
Nuevos PUFA $\omega 6$		
20:2 <sup><math>\Delta 11,14</math></sup> (EDA)	0	1,4±0,2
20:3 <sup><math>\Delta 8,11,14</math></sup> (DGLA)	0	0,3±0
20:4 <sup><math>\Delta 6,8,11,14</math></sup> (AA)	0	3,6±0,4
22:4 <sup><math>\Delta 7,10,13,16</math></sup> (DTA)	0	1,5±0,1
22:5 <sup><math>\Delta 4,7,10,13,16</math></sup> (DPA <sup><math>\omega 6</math></sup> )	0	3,0±0,4
Total	0	9,8
Nuevos PUFA $\omega 3$		
20:3 <sup><math>\Delta 11,14,17</math></sup> (ETrA)	0	2,3±0,1
20:4 <sup><math>\Delta 8,11,14,17</math></sup> (ETA)	0	0,2±0
20:5 <sup><math>\Delta 5,8,11,14,17</math></sup> (EPA)	0	2,6±0,3
22:5 <sup><math>\Delta 7,10,13,16,19</math></sup> (DPA <sup><math>\omega 3</math></sup> )	0	0,9±0,1
22:6 <sup><math>\Delta 4,7,10,13,16,19</math></sup> (DHA)	0	1,1±0,1
Total	0	7,1
Total de nuevos ácidos grasos	0	16,9
Total de ácidos grasos	100	100

#### Partición de los LC-PUFA en Clases de Lípidos

Con el objetivo de evaluar la partición de los LC-PUFA recién sintetizados entre TAG, fosfolípidos y galactolípidos de plástido, se sometieron los lípidos totales de hojas de *N. benthamiana* que expresan en forma transitoria los genes de la ruta metabólica para LC-PUFA a fraccionamiento de las clases lipídicas como se describió previamente, y se determinaron sus perfiles de ácidos grasos (Tabla 13). Los lípidos de hoja de *N. benthamiana* contienen clases lipídicas y perfiles de ácidos grasos típicos de hojas de plantas superiores (Fraser et al., 2004; Moreau et al., 1998).

5 Tanto los LC-PUFA recién sintetizados  $\omega 6$  como  $\omega 3$  estuvieron predominantemente confinados a las clases lipídicas que se encuentran normalmente afuera del plástido, mientras que los lípidos de plástido estuvieron esencialmente desprovistos de estos ácidos grasos. Por ejemplo, los TAG y fosfolípidos (PC, PE y PA) – los lípidos de hoja extraplastídicos dominantes – contuvieron hasta 20,4 % y 16,9 % de LC-PUFA recién sintetizados  $\omega 6$  y  $\omega 3$ , respectivamente. Remarcablemente, las hojas que expresan las rutas metabólicas completas de LC-PUFA, *AtDGAT1* y *P19* produjeron TAG enriquecidos con 37 % de LC-PUFA. Tuvo un interés particular la acumulación de los ácidos grasos nutricionalmente importantes ARA, EPA y DHA, presentes a 7,2 %, 5,9 % y 3 %, respectivamente, en los TAG de hoja. El fraccionamiento reveló que las clases lipídicas plastídicas dominantes, los MGDG, los DGDG y los PG, contuvieron solo 1,1 % y 0,3 % de los LC-PUFA recién sintetizados  $\omega 6$  y  $\omega 3$ , respectivamente. A pesar de que estas clases lipídicas de plástido representan los conjuntos más grandes de ácidos grasos en la hoja, colectivamente, estas clases contuvieron solo una pequeña cantidad de LC-PUFA  $\omega 6$  y  $\omega 3$  en comparación con los TAG. Interesantemente, la clase lipídica SQDG estuvo totalmente desprovista de los LC-PUFA recién sintetizados.

15 Los fraccionamientos de las clases lipídicas también se usaron para calcular las eficiencias enzimáticas de cada paso de las rutas metabólicas para LC-PUFA que están asociadas con el RE para los ácidos grasos de los TAG, que no tienen acceso a los lípidos plastídicos (Figura 17). La eliminación de las clases lipídicas de los plástidos de estos cálculos tuvo el efecto más importante en el paso de la  $\Delta 9$ -elongación desde ALA a ETrA, incrementando las eficiencias de conversión de 16 % a 55 %. Este incremento de tres veces en la eficiencia de conversión enzimática en este paso es debido a los grandes conjuntos de ALA en los plástidos que no están disponibles para esta enzima unida a RE (Tabla 13).

**Tabla 13.** Perfiles de ácidos grasos de las clases lipídicas de *N. benthamiana* que expresa P19, AtDGAT1 y los cinco genes para LC-PUFA como se describió en la Tabla 12. Los datos para TAG se generaron a partir de separaciones de las clases lipídicas usando TLC unidimensional, y las otras clases lipídicas se separaron en TLC bidimensional. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se informan los errores estándares.

Ácido graso	Extra-Plastídicos					Plastídicos				
	TAG	PC	PE	PA	MGDG	DGDG	SQDG	PG		
16:0	22,6±0,6	24,3±0,8	23,0±0,4	22,5±2,8	4,7±0,5	20,9±0,7	52,7±2,1	31,9±1,9		
16:1 <sup>Δ3t</sup>	0,2±0	0	0	0,8±0,7	0	0	0,5±0,5	21,6±1,5		
16:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	0,4±0	0,1±0,1	0	0	17,1±1,0	1,4±0,2	1,2±0,1	0		
18:0	7,8±0,7	8,9±1,5	8,6±1,6	8,7±2,2	0,8±0,1	3,8±0,3	7,2±1,1	5,2±0,7		
18:1 <sup>Δ9</sup>	3,2±0,9	6,7±2,3	1,8±0,6	5,6±2,2	0,9±0,1	1,3±0,1	2,3±0,3	11,8±0,2		
18:2 <sup>Δ9,12</sup> (LA)	9,2±0,2	16,6±1,2	21,2±1,5	18,1±0,6	2,7±0,1	3,9±0,1	5,3±0,1	12,9±0,5		
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup> (ALA)	13,8±1,6	12,7±1,6	13,6±1,7	14,4±1,2	70,5±1,9	66,8±0,9	30,7±2,2	15,1±1,8		
20:0	2,2±0,1	0,6±0	1,0±0,1	0,4±0,3	0	0	0	0		
Otros minoritarios	3,3	2,8	4,2	1,1	1,3	1,0	0,1	0,9		
Total	62,7	72,7	73,4	71,6	98	99,1	100	99,4		
<b>Nuevos PUFA ω6</b>										
20:2 <sup>Δ11,14</sup> (EDA)	4,2±0,3	3,2±0,2	1,9±0,1	2,8±0,1	0,2±0	0,1±0,1	0	0		
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup> (DGLA)	0,6±0	0,8±0	0,7±0,1	0,5±0,4	0	0	0	0		
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup> (AA)	7,2±0,7	5,3±0,3	8,4±0,3	7,3±0,2	0,5±0,1	0	0	0,5±0		
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup> (DTA)	1,7±0,5	5,8±0,1	3,7±0,3	5,6±0,2	0,2±0	0	0	0,1±0,2		
22:5 <sup>Δ4,7,10,13,16</sup> (DPA <sup>ω6</sup> )	6,7±0,4	1,9±0,1	2,5±0,3	1,8±0,4	0,2±0	0,2±0	0	0		
Total de nuevos LC-PUFA ω6	20,4	17,0	17,2	18,0	1,1	0,3	0	0,6		
<b>Nuevos PUFA ω3</b>										
20:3 <sup>Δ11,14,17</sup> (ETra)	6,7±0,6	3,3±0,2	2,2±0,1	3,0±0,2	0,5±0,1	0,6±0	0	0		
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup> (ETA)	0,5±0	0,1±0,2	0,1±0,2	0,1±0,2	0	0	0	0		
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup> (EPA)	5,9±0,4	2,3±0,3	3,4±0,2	3,1±0,3	0,3±0	0	0	0		
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup> (DPA <sup>ω3</sup> )	0,8±0	3,2±0,3	2,1±0,1	3,2±0,6	0,1±0	0	0	0		
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup> (DHA)	3,0±0,2	1,4±0,1	1,6±0,2	1,0±0,8	0	0	0	0		
Total de nuevos LC-PUFA ω3	16,9	10,3	9,4	10,4	0,9	0,6	0	0		
Total nuevos	37,3	27,3	26,6	28,4	2,0	0,9	0	0,6		
Total de ácidos grasos	100	100	100	100	100	100	100	100		

### Discusión

Estos experimentos mostraron que la expresión transitoria de una serie de genes de ruta metabólica en *N. benthamiana* u otras hojas de plantas emularon la expresión de plantas transformadas en forma estable y por lo tanto fue apropiado y predictivo para la expresión de las rutas metabólicas en semillas para la producción de aceites con LC-PUFA. El sistema de expresión transitoria proveyó una plataforma de expresión intercambiable que dio resultados rápidos y confiables para la ruta metabólica completa, en donde los componentes individuales se podían intercambiar fácilmente en rutas metabólicas recombinantes de pasos múltiples. El ensamblaje transitorio de la biosíntesis de LC-PUFA fue robusto y reproducible. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y produjeron puntos de datos poco dispersos, normalmente con un error estándar de menos de 5 %.

El primer paso en las rutas metabólicas de LC-PUFA ensambladas, una  $\Delta 9$  elongación, mostró una mayor tasa de elongación de LA que de ALA, como se observó previamente en plantas transformadas en forma estable (Fraser et al., 2004). Esta diferencia no se puede atribuir a preferencias de la enzima por sustratos de ácido graso ya que la expresión en levaduras mostró que la *Ig $\Delta 9$*  elongasa tiene igual preferencia por LA que por ALA (Qi et al., 2002). Es más probable que la mayor tasa de elongación observada para LA fuera un reflejo de la existencia de una mayor cantidad de LA que de ALA en el conjunto de los acil-CoA extraplastídicos de la hoja – el sitio de acción de la elongasa (Domergue et al., 2003; Fraser et al., 2004).

El análisis de las clases lipídicas demostró que todos los LC-PUFA formados *de novo* se encontraron en proporciones casi iguales tanto en el conjunto de las PC como en el de los TAG. Hubo pequeñas variaciones en esta proporción para los productos del segundo último paso de las rutas metabólicas, una  $\Delta 5$ -elongación que produce DTA y DPA, que fue menos abundante en los TAG en comparación con PC. Por el contrario, los productos de la  $\Delta 4$ -desaturación final, DPA<sup>w6</sup> y DHA, preferencialmente se acumularon en los TAG en comparación con PC. Estas variaciones pueden reflejar sutiles predilecciones de las enzimas editoras de membrana o de la *AfDGAT1* por estos productos. Es interesante notar que tanto las actividades de  $\Delta 5$ -elongación como de DGAT ocurren sobre los conjuntos de CoA, y que la competencia entre estas enzimas por el sustrato puede alterar la presencia de ácidos grasos en estos conjuntos de PC y TAG.

A partir de este estudio surgen muchas consecuencias. Primero, el ensayo transitorio en hoja demostró ser apropiado para ensayar enzimas de ácidos grasos, ya sea de forma individual como en combinaciones complejas. Esto es particularmente apto para enzimas que producen ácidos grasos que se pueden distinguir fácilmente del perfil de ácidos grasos endógeno de *N. benthamiana*, tal como los LC-PUFA en este estudio. La demostración de los ensayos de administración de ácidos grasos a enzimas aisladas y el rápido ensamblaje de LC-PUFA en aceites fue una indicación de que el ensayo transitorio en hoja era bien apropiado para la desaturación, elongación y ensamblaje de TAG en asociación al RE. Segundo, a pesar de que los aceites de LC-PUFA son un objetivo actual de las tecnologías de transformación de vegetales, las células de hoja proveen un abanico de ventajas para otras plataformas de expresión heterólogas. Las células de hoja proveen un amplio rango de metabolitos no disponibles en otros huéspedes de expresión, y estos ahora pueden convertirse en objetivos de modificación que requieren rutas metabólicas recombinantes. Más aun, los vegetales procesan más fielmente transgenes eucarióticos, incluyendo edición de ARN, modificaciones posteriores a la traducción y localización en orgánulos.

Finalmente, el ensayo en *N. benthamiana* podría ser apropiado para ensayos de tamizado de bibliotecas de ADNc. Esta sugerencia se basa en la detección de actividad casi máxima para siete genes diferentes en una zona de infiltración individual de la hoja, lo que sugiere que en esta configuración las bibliotecas de ADNc clonadas dentro de un vector de expresión binaria podrían infiltrarse en forma sistemática en las hojas. Los cálculos sugieren que se podrían expresar al menos 7 clones diferentes, incluyendo P19 a OD<sub>600nm</sub> 0,2, en un punto individual. Alternativamente, se podrían agregar genes que forman rutas metabólicas parciales o incompletas en cada infiltración y de esa forma se podrían ensayar en forma rutinaria clones agrupados de biblioteca para estudiar nuevos pasos o flujos favorecidos.

### **Ejemplo 10. Biosíntesis Eficiente de DHA en Células Vegetales**

Se demostró la presencia de las actividades enzimáticas de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (SEQ ID NO:8 codificada por SEQ ID NO:7),  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:4 codificada por SEQ ID NO:3),  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:26 codificada por SEQ ID NO:25),  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:6 codificada por SEQ ID NO:5) y  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:73 codificada por SEQ ID NO:72) junto con la DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:74 codificada por SEQ ID NO:75) *in planta* usando un sistema de expresión transitoria mejorado en *Nicotiana benthamiana* como se describió en el Ejemplo 1.

Se hizo una construcción genética 35S: Mic1545-d6D que codifica  $\Delta 6$ -desaturasa bajo el control del promotor constitutivo 35S mediante la inserción de la región codificante completa de pGA4, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 (Ejemplo 4, anterior) en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP2064. Se hizo una construcción genética 35S:Pyrco-d6E que codifica  $\Delta 6$ -elongasa mediante la inserción de la región codificante completa de

0804673\_Pyrco-elo1\_pGA18, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP2060. Se hizo una construcción genética 35S:Pavsa-d5D que codifica  $\Delta 5$ -desaturasa mediante la inserción de la región codificante completa de 0804674\_Pavsa-d5D\_pGA15, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP2067. Se hizo una construcción genética 35S:Pyrco-d5E que codifica  $\Delta 5$ -elongasa mediante la inserción de la región codificante completa de 0804675\_Pyrco-elo2\_pGA4, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP2061. Se hizo una construcción genética 35S:Pavsa-d4D que codifica  $\Delta 4$ -desaturasa mediante la inserción de la región codificante completa de 0804676\_Pavsa-d4D\_pGA15, contenida en un fragmento *Swal*, en 35S-pORE04 en el sitio *Smal-EcoRV*, generando pJP2068. Se hizo una construcción genética 35S:Arath-DGAT1 que codifica la enzima DGAT1 mediante la inserción de la región codificante completa de pXZP513E, contenida en un fragmento *BamHI-EcoRV*, en 35S-pORE04 en el sitio *BamHI-EcoRV*, generando pJP2078.

Estos vectores quiméricos se introdujeron en forma individual en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 y se mezclaron las células transgénicas de los cultivos de estas y se infiltró la mezcla en el tejido de hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* en el invernadero. Se hicieron crecer las plantas durante cinco días adicionales luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis por GC lo que reveló que estos genes estaban funcionando para producir DHA en *Nicotiana benthamiana*. El tejido de hoja transformado con estos genes contuvo SDA (2,3 %), ETA (0,7 %), EPA (0,8 %), DPA (2,8 %) y DHA (4,4 %) (Tabla 14). El tejido de hoja también contuvo niveles traza de GLA, ETA y ARA. Las eficiencias de conversión fueron como sigue: 17,4 % del ALA que se produjo en la célula se convirtió a EPA (incluyendo EPA subsiguientemente convertido a DPA o DHA); 15,5 % del ALA se convirtió a DPA o DHA; 9,6 % del ALA que se produjo en la célula se convirtió a DHA; mientras que 40 % del ALA que se produjo en la célula que estaba  $\Delta 6$ -desaturó subsiguientemente se convirtió a DHA. Debido a la expresión transitoria de los transgenes en este experimento, se esperarían mayores eficiencias que las anteriores en células transformadas en forma estable.

Cuando se fraccionaron los lípidos totales extraídos de tejido de hoja mediante TLC para separar las clases lipídicas, y se analizaron las fracciones de TAG y de lípidos polares para composición de ácidos grasos por FAME, se observó que el nivel de DHA en los TAG era 7 % como porcentaje de los ácidos grasos totales, y en los lípidos polares el nivel de DHA era de 2,8 %. El menor nivel en la clase de lípidos polares se cree que fue debido a la contribución relativa de los lípidos de cloroplasto en las hojas, favoreciendo a los lípidos polares, y a la expresión transitoria de los genes en lugar de la inserción estable de los transgenes en el genoma de las células hospedadoras.

**Tabla 14.** Composición de ácidos grasos de lípidos de hojas transformadas con una combinación de desaturasas y elongasas.

Ácido graso	Ácido graso	Células no transformadas	Células transformadas
16:0	palmitico	17,1	20,4
16:1d7		0,1	0,4
16:1d9		0,2	0,2
C6:1d?		0,5	0,4
16:1d?		0,5	0,4
17:1d9		0,9	0,7
16:2		0,9	0,9
16:3		6,6	5,4
18:0	esteárico	2,1	3,6
18:1d7		0,0	0,0
18:1d9	oleico	0,8	2,6
18:1d11		0,0	0,0
18:1d12		0,3	0,6
18:1d13		0,2	0,2
18:2n6	LA	5,1	10,8
18:3n6	GLA	0,7	1,9
18:3n3	ALA	57,8	35,0
20:0		0,4	0,7
20:1d5		0,4	0,3
18:4n3	SDA	0,4	2,3
20:1d8		0,0	0,0
20:1d11		0,0	0,0
20:2n6	EDA	0,1	0,2
20:3n6	DGLA	0,3	0,4

Ácido graso	Ácido graso	Células no transformadas	Células transformadas
20:4n6	ARA	0,4	0,5
20:3n3	ETrA	0,2	0,2
22:0		0,2	0,2
20:4n3	ETA	0,0	0,7
22:1d9		0,0	0,9
20:5n3	EPA	0,8	0,8
22:2n6		0,1	0,2
22:4n6		0,1	0,1
22:3n3		1,1	1,2
24:0		0,4	0,4
22:5n6		0,4	0,2
24:1d9		0,8	0,1
22:5n3	DPA	0,2	2,8
22:6n3	DHA	0,1	4,4

Este experimento demostró que la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 aislada tuvo una preferencia sustancial por el sustrato  $\omega 3$  ALA en comparación con el sustrato  $\omega 6$  LA. El experimento también demostró que la expresión de genes apropiados puede resultar en la acumulación de porcentajes sustanciales de LC-PUFA en la hoja, más notablemente para EPA, DPA y DHA.

Este experimento también mostró el uso de un sistema de ensayo transitorio en *Nicotiana benthamiana* para el ensayo rápido de diferentes rutas metabólicas de biosíntesis de ácidos grasos y para la selección de combinaciones óptimas de genes. Este sistema se podría usar para comparar rápidamente las actividades relativas de genes con función homóloga, así como también para la comparación de rutas metabólicas biosintéticas completas.

#### Discusión: Síntesis eficiente de DHA en tejido de hoja y semilla

Basándose en estos datos, se predijo que se producirían en semilla los mismos niveles de EPA, DPA y DHA, o incluso mayores, cuando se usan promotores específicos de semilla para expresar esta combinación de genes, o un grupo similar. El eficiente flujo de ácidos grasos que se observó entre ALA y EPA, y a través de DPA y DHA, se cree que fue debido a la combinación de elongasas eficientes con acil-CoA desaturasas, operando de esta forma sobre ácidos grasos predominantemente en el conjunto de los acil-CoA. Más aun, se predijo que se podría conseguir la producción de EPA, DPA, DHA y otros LC-PUFA tanto en hoja como en semilla de una planta transgénica, o en la semilla y en otro tejido diferente a las hojas, mediante el uso de un promotor con la especificidad de tejido apropiada, o combinaciones de promotores. Los promotores fusionados podrían ser capaces de dirigir la producción de las enzimas en ambos tipos de tejido. La planta resultante probablemente podría ser útil tanto para extracción de aceite, en particular desde la semilla, como para materia prima con un procesamiento mínimo.

#### **Ejemplo 11. Biosíntesis más eficiente de DHA en células vegetales**

Se demostraron las actividades enzimáticas de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (SEQ ID NO:8 codificada por SEQ ID NO:7),  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:4 codificada por SEQ ID NO:3),  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:26 codificada por SEQ ID NO:25),  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:6 codificada por SEQ ID NO:5) y  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:73 codificada por SEQ ID NO:72) junto con la DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:74 codificada por SEQ ID NO:75) *in planta* usando un sistema de expresión mejorado en *Nicotiana benthamiana* como se describió en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 10. Este experimento se optimizó para usar plantas más jóvenes, más saludables de *N. benthamiana*.

Estos vectores quiméricos que se describieron en el Ejemplo 10 se introdujeron individualmente en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 y se mezclaron células transgénicas de cultivos de estas y se infiltró la mezcla en tejido de hoja de plantas de *Nicotiana benthamiana* en el invernadero. Se hicieron crecer las plantas durante cinco días adicionales luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis por GC lo que reveló que estos genes estaban funcionando para producir DHA en *Nicotiana benthamiana* (Tablas 15 y 16). El tejido de hoja transformado con estos genes contuvo SDA (2,0 %), ETA (0,4 %), EPA (0,7 %), DPA (4,3 %) y DHA (4,4 %). El tejido de hoja también contuvo niveles traza de GLA, ETA y ARA. Las eficiencias de conversión fueron como sigue: 23,4 % del ALA que se produjo en la célula se convirtió a EPA (incluyendo EPA subsiguientemente convertido a DPA o DHA); 21,6 % del ALA se convirtió a DPA o DHA; 10,9 % del ALA que se produjo en la célula se convirtió a DHA; mientras que 37,2 % del ALA que se produjo en la célula que estaba  $\Delta 6$ -desaturado subsiguientemente se convirtió a DHA. Debido a la expresión transitoria de los transgenes en este experimento, se esperarían eficiencias mayores a las anteriores en células transformadas en forma estable.

5 Cuando se fraccionaron los lípidos totales extraídos de tejido de hoja mediante TLC para separar las clases lipídicas, y se analizaron las fracciones de TAG y de lípidos polares para composición de ácidos grasos por FAME, se observó que el nivel de DHA en los TAG era de 15,9 % como porcentaje de los ácidos grasos totales, y en los lípidos polares el nivel de DHA era de 4,4 %. El menor nivel en la clase de lípidos polares se cree que fue debido a la contribución relativa de los lípidos de cloroplasto en las hojas, favoreciendo a los lípidos polares, y a la expresión transitoria de los genes en lugar de la inserción estable de los transgenes en el genoma de las células hospedadoras.

**Tabla 15.** Composición de ácidos grasos de lípidos de hojas transformadas con una combinación de desaturasas y elongasas.

Ácido graso	Control	Ruta Metabólica Pavs-D5E DHA		Ruta Metabólica Pyrco-D5E DHA	
	Lípidos Totales	Lípidos Totales	TAG	Lípidos Totales	TAG
AG usuales					
16:0	15,9±0,2	17,0±0,1	20,2	16,6±0,1	21,6
16:1 <sup>Δ3t</sup>	1,7±0,1	1,5±0,2	0,3	1,5±0,1	0,3
16:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	6,3±0,3	5,2±0,1	0,4	5,6±0,1	0,6
18:0	3,6±0,3	3,5±0,1	5,9	3,3±0,1	6,5
18:1 <sup>Δ9</sup>	2,8±0,1	3,4±0,1	5,1	2,8±0,2	5,6
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	18,7±0,1	14,1±0,4	15,2	13,0±0,1	17,3
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	45,6±1,4	39,1±0,4	6,9	40,2±0,5	6,7
20:0	1,3±0,4	0,7±0	1,8	0,6±0	2,0
Otros minoritarios	4,1	2,5	6,3	2,3	6,2
Total	100	87,0	62,1	85,9	66,8
Nuevos PUFA w6					
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	-	1,6±0,1	3,3	2,1±0,2	4,3
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-	-	-	-	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	-	0,3±0,1	0,5	0,2±0	-
Total	0	1,9	3,8	2,3	4,3
Nuevos PUFA ω3					
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	-	1,5±0,1 (22 % D6D)	3,8	2,0±0 (23 % D6D)	6,4
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>	-	0,5±0 (86 % D6E)	1,5	0,4±0 (83 % D6E)	1,6
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	-	4,1±0,2 (95 % D5D)	14,2	0,7±0 (96 % D5D)	1,5
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>	-	2,4±0,1 (55 % D5E)	1,6	4,3±0 (93 % D5E)	3,5
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-	2,6±0,1 (52 % D4D)	13,0	4,4±0,1 (51 % D4D)	15,9
Total	0	11,1	34,1	11,8	28,9
Total de nuevos ácidos grasos	0	13,0	37,9	14,0	33,2
Total de Ácidos grasos	100	100	100	100	100

10

**Tabla 16.** Eficiencias de conversión de hojas transformadas con una combinación de desaturasas y elongasas.

Ácido Graso	Total		Enzima	Eficiencia de Conversión		
LA	13					
GLA	2,1	15,0 %	d6D			
DGLA	0	8,7 %	d6E			
AA	0,2	100,0 %	d5D			

Ácido Graso	Total		Enzima	Eficiencia de Conversión		
ALA	40,2					
SDA	2	22,7 %	d6D	18,1 %	d6D a EPA+DPA+DHA	
ETA	0,4	83,1 %	d6E	16,7 %	d6D a DPA+DHA	
EPA	0,7	95,9 %	d5D	8,5 %	ALA a DHA	
DPA	4,3	92,6 %	d5E	46,8 %	EPA a DHA	
DHA	4,4	50,6 %	d4D			
	<b>TAG</b>					
LA	17,3					
GLA	4,3	19,9 %	d6D			
DGLA	0	0,0 %	d6E			
AA	0	0,0 %	d5D			
ALA	6,7					
SDA	6,4	81,2 %	d6D	58,7 %	d6D a EPA+DPA+DHA	
ETA	1,6	77,9 %	d6E	54,5 %	d6D a DPA+DHA	
EPA	1,5	92,9 %	d5D	44,7 %	ALA a DHA	
DPA	3,5	92,8 %	d5E	76,1 %	EPA a DHA	
DHA	15,9	82,0 %	d4D			

*Discusión: Síntesis más eficiente de DHA en tejido de hoja y semilla*

5 Este resultado pareciera facilitar el terreno para avances similares en el campo de los TAG de semilla debido a la sustancial conservación de los mecanismos extraplastídicos de síntesis de lípidos entre tejidos de hoja y semilla (Ohlrogge y Browse, 2004; Bates et al., 2007). Los inventores postulan que probablemente varios elementos sean responsables por este gran incremento de producción: 1. el uso de una acil-CoA  $\Delta 6$ -desaturasa específica para  $\omega 3$  incrementa el flujo hacia la ruta metabólica para  $\omega 3$  y disminuye la competición con sustratos  $\omega 6$  paralelos por los subsiguientes pasos metabólicos; 2. una  $\Delta 5$ -elongasa altamente eficiente incrementa claramente la cantidad de DPA disponible para la  $\Delta 4$ -desaturación a DHA; 3. la reducción del silenciamiento génico mediante el uso de unidades transcripcionales independientes y el uso de una proteína supresora vírico (P19).

15 La fuerte preferencia hacia  $\omega 3$  mostrada por la  $\Delta 6$ -desaturasa es claramente deseable cuando se intenta construir una planta de suelo que acumule los LC-PUFA  $\omega 3$  EPA y DHA, debido a que la actividad  $\Delta 17$ -desaturasa adicional que se requeriría para convertir AA (20:4<sup>D5,8,11,14</sup>) a EPA no se requiere, simplificando de eso modo tanto la construcción metabólica como los desafíos regulatorios.

20 Además del paso optimizado previamente, el uso de la  $\Delta 5$ -elongasa de *P. cordata* altamente eficiente resultó en un perfil de ácidos grasos de la fracción TAG (aceite) que se asemeja mucho al aceite de atún, un aceite de pescado notable por su alto contenido en DHA y bajo contenido de intermediarios (Figura 18). Además, la actividad exhibida por la  $\Delta 5$ -elongasa de *P. cordata* en *N. benthamiana* es por lejos la  $\Delta 5$ -elongación más eficiente que hayan visto los inventores, y el uso de este gen supera en forma eficaz el gran cuello de botella de la  $\Delta 5$ -elongación que se ha experimentado en otros intentos de producción transgénica de DHA.

25 Finalmente, a pesar de que se requiere claramente el uso de genes óptimos, los inventores consideran probable que el método por el cual se introdujeron estos transgenes (o sea como casetes de expresión independiente y en presencia de un supresor de silenciamiento génico) jugó un importante rol para conseguir los altos niveles de DHA en este estudio. La manipulación metabólica para la producción de LC-PUFA se ha basado hasta ahora en construcciones multigénicas relativamente grandes que se insertan al azar en el genoma del huésped y, mientras muchos grupos han tenido buenos resultados con este método, existen indicaciones de que es difícil de obtener eventos que exhiban una misma expresión para todos los transgenes (WO 2004/017467). Además, los efectos de silenciamiento pueden reducir la eficiencia con el paso de generaciones (Matzke et al., 2001). Es posible que las estrategias de transformación alternativas tales como los cromosomas artificiales que involucran formación de centrómeros *de novo* sobre una unidad ensamblada en forma independiente y la manipulación de mini-cromosomas se puedan requerir finalmente para una exitosa manipulación metabólica estable de LC-PUFA (Yu et al., 2007).

**Ejemplo 12. Ensamblaje transgénico de una ruta metabólica completa desde ALA a DHA usando genes de un organismo individual**

Se reconstituyó la ruta metabólica completa de ALA a DHA usando genes que codifican las enzimas de *P. salina*, que consisten en  $\Delta 9$ -elongasa,  $\Delta 8$ -desaturasa,  $\Delta 5$ -desaturasa,  $\Delta 5$ -elongasa y  $\Delta 4$ -desaturasa, y se ensamblaron en *N. benthamiana*. El análisis por GC del tejido de hoja total cinco días luego de la agroinfiltración demostró la producción de 0,7 % de DHA (Tabla 17). Esta es la primera vez que se informa de una ruta metabólica transgénica, que consiste en genes de un mismo organismo, desde ALA a DHA.

**Tabla 17.** Composición de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos totales) de tejido de hoja de *Nicotiana benthamiana* transformado en forma transitoria con construcciones binarias de genes individuales bajo el control de 35S de CaMV. La ruta metabólica de DHA consiste en las  $\Delta 9$ -elongasa,  $\Delta 8$ -desaturasa,  $\Delta 5$ -desaturasa,  $\Delta 5$ -elongasa y  $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*. Se indican las desviaciones estándares entre infiltraciones separadas llevadas a cabo por triplicado.

Ácido graso	Control	Pavpi- $\Delta 9E$ DHA
Ácidos grasos usuales		
16:0	15,7 $\pm$ 0,6	15,9 $\pm$ 0,2
16:1 $\Delta 3t$	1,5 $\pm$ 0	1,4 $\pm$ 0,1
16:3 $\Delta 9,12,15$	6,8 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,3
18:0	3,0 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,2
18:1 $\Delta 9$	2,2 $\pm$ 0	2,7 $\pm$ 0,3
18:2 $\Delta 9,12$	11,8 $\pm$ 0,4	8,6 $\pm$ 0,6
18:3 $\Delta 9,12,15$	56,0 $\pm$ 1,4	49,0 $\pm$ 1,4
Otros minoritarios	3,0 $\pm$ 0	2,8 $\pm$ 0
Total	100	90,0
Nuevos PUFA $\omega 6$		
20:2 $\Delta 8,11$	–	1,7 $\pm$ 0,2
20:3 $\Delta 8,11,14$	–	0,5 $\pm$ 0
20:4 $\Delta 5,8,11,14$	–	2,4 $\pm$ 0,1
22:4 $\Delta 7,10,13,16$	–	1,2 $\pm$ 0
22:5 $\Delta 4,7,10,13,16$	–	–
Total	0	5,8
Nuevos PUFA $\omega 3$		
20:3 $\Delta 11,14,17$	–	1,5 $\pm$ 0,2
20:4 $\Delta 8,11,14,17$	–	0,2 $\pm$ 0
20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$	–	1,2 $\pm$ 0,1
22:5 $\Delta 7,10,13,16,19$	–	0,6 $\pm$ 0
22:6 $\Delta 4,7,10,13,16,19$	–	0,7 $\pm$ 0,1
Total	0	4,2
Total nuevos ácidos grasos	0	10,0
Total de ácidos grasos	100	100

**Ejemplo 13. Expresión específica de VSP en semillas vegetales en desarrollo**

Inicialmente se insertaron las regiones codificantes de proteínas de cinco proteínas supresoras víricas (VSP), denominadas P19, V2, P38, PePo y RPV-P0, en el vector binario pART27 (Gleave, 1992) bajo el control del promotor 35S para una expresión constitutiva fuerte en los tejidos vegetales. Estas proteínas se han caracterizado como VSP como sigue. P19 es una proteína supresora del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) que se une a los siARN de 21 nucleótidos de longitud antes de que los mismos guíen al clivaje dirigido por Argonauta de los ARN homólogos (Voinnet et al., 2003). V2, una proteína supresora del virus de las hojas amarillas rizadas del tomate (TYLRV), se une a la proteína vegetal SGS3 (Glick et al., 2008), una proteína que se piensa que se requiere para la producción de intermediarios de ARN de doble cadena a partir de sustratos de ssARN (Beclin et al., 2002). La P38 es una proteína supresora del virus de la arruga del nabo (TCV) e inhibe la actividad de las polimerasa dependiente

de ARN (RdRP) que es crítica para la producción de siARN y se une a la proteína Dicer DCL4 (Ding y Voinnet, 2007). Las proteínas P0 tales como PePo y RPV-P0, de los polerovirus, tienen como objetivo a proteínas Argonauta y aumentan su degradación (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). Con el objetivo de establecer la función de estas proteínas, para incrementar la expresión de transgenes, como supresoras de silenciamiento, se coinfiltraron las cinco construcciones de VSP dirigidas por 35S en *Agrobacterium* junto con una construcción de GFP dirigida por 35S en hojas de *Nicotiana benthamiana*. En todos los casos, la presencia de las VSP incrementó y extendió la expresión de la GFP, confiriendo mayores niveles de actividad del gen de GFP en particular luego de 4 días después de la inoculación con las cepas de *Agrobacterium*, lo que confirma la función de las proteínas como supresores del silenciamiento en este formato de ensayo.

Las cinco regiones codificantes de VSP se insertaron cada una en un segundo vector binario, pXRZ393, basado en un vector de esqueleto pART27, de modo que la expresión de las VSP estuvo bajo el control de un promotor específico de semilla FP1 (Ellerstrom et al., 1996) lo que provee una expresión de las VSP en los cotiledones de semillas en desarrollo de plantas dicotiledóneas. Las construcciones se usaron para generar plantas transformadas de *Arabidopsis* de acuerdo a los métodos que se describieron en el Ejemplo 1. Se obtuvieron al menos 20 plantas transformadas para cada gen quimérico codificante de una VSP. Las plantas fueron viables y en general fenotípicamente normales según se vio a partir de su crecimiento en medio selectivo y en suelo, creciendo normalmente a plantas adultas fértiles que generan semillas viables. El único fenotipo morfológico que apareció alterado en las plántulas estuvo en los cotiledones que emergieron de algunas de las semillas luego de la germinación para P19, PePo y RPV-P0. Las plántulas transformadas con la construcción específica de semilla que codifica P19 tuvieron cotiledones planos caviformes sin la curvatura hacia abajo distintiva de las plántulas de tipo salvaje. Las plántulas transformadas con la construcción que codifica PePo produjeron un fenotipo de 'bailarina', en donde los cotiledones apuntaban hacia arriba con una curvatura hacia adentro o cóncava. Estas plantas desarrollaron normalmente hojas verdaderas. Las plántulas que expresan RPV-P0 eran tupidas, y tendían a retener una forma de crecimiento tupida a lo largo del crecimiento vegetativo. Las plántulas de V2 y P38 no mostraron ningún fenotipo significativo evidente.

Además del desarrollo de los cotiledones, las plántulas transformadas con las construcciones de P19 y PoPe crecieron en forma normal y fueron indistinguibles de las plantas control en su crecimiento y desarrollo subsiguientes. El promotor que expresaba la VSP en este experimento, FP1, está bien caracterizado con una expresión fuerte pero limitada en cotiledones de *Arabidopsis* en desarrollo, durante el desarrollo de las semillas (Ellerstrom et al., 1996). Basándose en los fenotipos de los cotiledones emergentes, los inventores sugieren que la expresión dirigida por FP1 de P19, PePo o RPV-P0 en semillas en desarrollo se puede solapar con la biogénesis de ARN pequeños requeridos para el desarrollo normal del cotiledón. Estos cambios del desarrollo del cotiledón relacionados con VSP no tienen un impacto sobre el desarrollo global de las plantas transgénicas, y los subsiguientes crecimiento y desarrollo normales de las plantas mostraron que cualquier pequeña expresión de las VSPs a partir del promotor FP1 en tejidos distintos a la semilla en desarrollo fue minoritario e insignificante. Esto fue opuesto a estudios previos en los que la expresión constitutiva de muchas VSPs en tejidos vegetales fue muy deletérea (Mallory et al., 2002; Chapman et al., 2004; Chen et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Zhang et al., 2006; Lewsey et al., 2007; Meng et al., 2008).

La falta de un fenotipo para las VSPs V2 y P38 puede ser el reflejo de que estas VSP tienen como objetivo al metabolismo de ARNs pequeños de forma que no afectan la biogénesis o el reconocimiento de los ARN pequeños relacionados al desarrollo. Se ensayó la funcionalidad de cada una de las VSP usando un ensayo con GFP en *Nicotiana benthamiana*.

#### **Ejemplo 14. Desarrollo de un marcador visual específico de semilla para encontrar y evaluar semillas T1 transformadas con construcciones con VSP**

Los datos que se describieron en el Ejemplo 13 mostraron que las semillas, y las subsiguientes plantas de la progenie, pudieron tolerar la expresión de las VSP a partir de los promotores específicos de semilla sin efectos secundarios deletéreos. Los inventores también consideraron la posibilidad de que las plantas transformadas que se generaron como se describió previamente estuvieran expresando solo bajos niveles de las VSP, permitiendo de ese modo que la semilla sobreviviera, seleccionando en forma eficaz contra las semillas transformadas que potencialmente expresan cantidades letales de VSP que podrían por lo tanto no recuperarse bajo las condiciones utilizadas.

Para evaluar más precisamente la expresión de los transgenes en la semilla T1, se desarrolló un marcador visual de transformación y expresión para usar en semillas transgénicas. Las semillas de *Arabidopsis* como otras semillas dicotiledóneas contienen un embrión paternal y endosperma rodeado por un recubrimiento de semilla materno. Durante la transformación de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium*, el tejido paternal se convierte en transformado por el ADN-T mientras que el tejido materno permanece sin transformar. No se obtiene tejido materno transformado hasta la producción de la semilla T2 de la siguiente generación. Para proveer un sistema de cribado útil, se modificó un gen que codifica proteína fluorescente verde (GFP) para promover una fuerte secreción de la proteína hacia afuera de la célula. Se había demostrado de una localización de ese tipo para GFP permite la recuperación visual de la semilla T1 transformada (Nishizawa et al., 2003) mediante la detección de la GFP secretada que se produce en el embrión y endosperma de la T1 transformada, a través del delgado, pero no

transformado, recubrimiento de la semilla (Fuji et al., 2007).

Se construyó un gen quimérico que codifica una GFP secretada como sigue. El gen contuvo dos intrones, uno en la región no traducida 5' (5'UTR) y un segundo en la región codificante de la proteína de GFP. Estos intrones se incluyeron para mejorar la expresión del gen quimérico (Chung et al., 2006) y para asegurar que cualquier señal de GFP que se detecte en las semillas solo pueda ser el resultado de la expresión del gen en las células vegetales, y no una expresión filtrada desde las células de *Agrobacterium*. Se modificó una versión interrumpida por intrón de la GFP humanizada (Clontech) que codifica una proteína GFP que se localizaría en el citoplasma (Brosnan et al., 2007) para promover la secreción al apoplasto a través del retículo endoplásmico (RE) de acuerdo a la publicación de Nishizawa et al. (2003). La construcción con la GFP modificada para secreción a apoplasto incluyó un péptido de secreción de conglucina que se agregó como una fusión dentro del marco de traducción en el extremo N-terminal de GFP, y cuatro residuos de glicina agregado en el extremo C-terminal para facilitar la secreción desde el RE. Estos agregados al gen de la GFP quimérica se llevaron a cabo mediante síntesis génica para la región 5' y mediante modificaciones de secuencia mediadas por PCR para las adiciones de glicina del lado C-terminal. La región codificante para esta GFP secretada se insertó corriente abajo de un promotor FP1 que tenía un intrón de un gen de catalasa en el 5'UTR. Se insertó la secuencia completa de la FP1-GFP de secreción corriente arriba de una señal de poliadenilación *nos3'* dentro de un vector binario de la serie pORE. La construcción que contenía el gen quimérico que codifica la GFP de secreción se designó como pCW141.

Para confirmar la expresión y secreción de la proteína GFP, se subclonó la región génica que codifica la secuencia de la GFP de secreción, pero sin el promotor FP1 o la 5'UTR de pCW141 en un casete de expresión pCaMV35S–OCS3', para producir pCW228, y se introdujo mediante transformación mediada por *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana*. La expresión del gen y la secreción de la proteína GFP se confirmó usando microscopía confocal (Leica).

Basándose en que la construcción era correcta, se introdujo pCW141 en plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 a través de métodos mediados por *Agrobacteria* como se describió en el Ejemplo 1. Las semillas de las plantas de *Arabidopsis* inmersas con pCW141, la construcción con GFP de secreción dirigida por FP1, se colectaron y cribaron para semillas positivas para GFP usando un microscopio de disección equipado con detección de fluorescencia (Leica MFZIII). Las semillas que tenían fluorescencia de color verde se identificaron fácilmente incluso cuando una gran mayoría de semillas T1 de la población estaba sin transformar. Estas semillas positivas para GFP se seleccionaron y crecieron en medio selectivo para confirmar la presencia del gen marcador seleccionable por resistencia a kanamicina unido la construcción del gen quimérico en el ADN-T. Se juntaron otras 20 semillas positivas y se confirmó la expresión de proteína GFP mediante transferencia Western usando un anticuerpo contra GFP.

#### *Selección de expresión de VSP en semilla T1 usando un marcador de GFP de secreción*

Se insertó cada uno de los cuatro genes quiméricos que codifican las VSP: P19, P38, V2 y P38, cada uno bajo el control del promotor FP1 para el desarrollo de expresión específica de cotiledón, dentro del vector de selección por GFP pCW141 que se describió previamente para producir pCW161, pCW162, pCW163 y pCW164, respectivamente. Cada uno de estos vectores binarios tuvo unido genes quiméricos para la expresión de una VSP y la GFP de secreción, y por lo tanto permitió que la semilla transgénica transformada con las construcciones se identifique, seleccione y analice mediante el fenotipo de la GFP sin un crecimiento en medio selectivo. Era de esperar que, en la mayoría de los transformantes, el gen que codifica la VSP se integre y por lo tanto se una con el gen que codifica la GFP.

Las semillas que se obtuvieron a partir de las plantas de *Arabidopsis* que había sido inoculada con *Agrobacterium* conteniendo las construcciones de combinación VSP-GFP, de acuerdo al método del Ejemplo 1, se colectaron y cribaron para fluorescencia de GFP como se describió previamente. Las semillas con fluorescencia verde se colectaron a mano y se hicieron crecer en medio selectivo para determinar si las mismas también se habían transformado con el gen marcador de selección. En todos los casos, la semilla positiva para GFP creció en el medio selectivo, y exhibió los mismos fenotipos de cotiledón que las plantas que se habían transformado con los genes VSP sin el gen para GFP como se describió previamente. En ningún caso se observó que una semilla positiva para GFP falle en el crecimiento en el medio selectivo. Se podrían haber esperado dichas semillas si algunos eventos de transformación hubiesen dado origen a células en las semillas en desarrollo en las que los niveles de expresión de VSP fuesen tan altos para causar letalidad. La ausencia de dichas semillas en las poblaciones transformadas demostró que la expresión de la VSP fue tolerada en las semillas cuando esta expresión fue a partir del promotor FP1. La ausencia de dichos efectos deletéreos fue opuesta a los informes de efectos deletéreos ante la expresión en forma constitutiva de muchas VSP (Mallory et al., 2002; Chapman et al., 2004; Chen et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Zhang et al., 2006; Lewsey et al., 2007; Meng et al., 2008).

Por lo tanto, el uso de un marcador detectable en forma visual tal como GFP probó una manera poderosa y eficaz para identificar, seleccionar y analizar eventos transgénicos que incorporan genes conectados tales como los que codifican las VSP, desaturasas, elongasas u otras enzimas modificadoras de ácidos grasos.

*Cuantificación de la expresión de GFP en semillas que expresan VSP en forma postembriónica*

Se cuantificó la expresión de GFP en semilla T1 y T2 que expresan VSP a partir del promotor FP1 usando microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes digital. Estos análisis mostraron claramente que la expresión de GFP no se vio afectada por la introducción conjunta de un gen que codifica VSP bajo el control del promotor específico de cotiledón en desarrollo. Se analizarán estudios extendidos sobre el desempeño de las construcciones de GFP-VSP sobre generaciones subsiguientes y en eventos de transformación independientes. Se predice que la presencia de las VSP resultará en niveles de expresión promedio mayores y más estables en las sucesivas generaciones de semilla.

**Ejemplo 15. Coexpresión de VSP con genes para la síntesis de LC-PUFA en semillas**

Para establecer que las VSP son capaces de proteger o mejorar el desempeño de los transgenes en semillas, se diseñaron algunos vectores de expresión que se consideraron más propensos a la supresión mediada por el huésped (silenciamiento) que un vector con solo un gen individual, para incrementar las eficiencias relativas de las VSP. Se construyó una serie de vectores con cada uno conteniendo cinco genes de desaturasas o elongasas para la síntesis de DHA en semillas, usando la misma configuración de los genes en cada uno. Un factor que se tuvo en cuenta para hacer estas construcciones más propensas al silenciamiento (menor expresión) fue el uso del mismo promotor (FP1) para dirigir a cada gen. Se usó el promotor FP1 debido que el mismo era relativamente pequeño y reduce el tamaño total del vector y el espaciamiento entre cada región codificante. Más aun, cada casete de gen tuvo la misma orientación, lo que se consideró que aumentaría la probabilidad de silenciamiento. Tres genes de la ruta metabólica de LC-PUFA tenían regiones codificantes que se habían optimizado por codones (A-B-C) para su óptima expresión en plantas mientras que dos (E-D) eran secuencias nativas como se las obtiene de las microalgas. El mismo juego de cinco genes se había expresado previamente en hojas para producir el ensamblaje de una ruta metabólica biosintética completa de LC-PUFA (Ejemplo 11). Se incluyó un gen adicional que codifica la VSP P19 en el primer vector de la serie, se incluyó un gen que codifica V2 en el segundo vector, mientras que el tercer vector de la serie no tuvo VSP.

Se construyeron estos vectores, pJP3057 (Figura 19), pJP3059 (Figura 20) y (Figura 21) y se transformaron en paralelo como sigue. Primero se clonaron los genes de desaturasa, elongasa o de supresor vírico entre un promotor FP1 y el terminador *nos* contenidos en un vector de clonación. Luego se clonaron los casetes promotor-gen-terminador en forma secuencial y en la misma orientación en un esqueleto de vector binario. pJP3057 contuvo la ruta metabólica completa para DHA mientras que pJP3059 y pJP3060 difirieron solo en el agregado de un casete FP1-P19-NOS o FP1-V2-NOS, respectivamente. Los pasos de construcción fueron como sigue. Primero, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas pusilla* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015, antes de clonar el fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *EcoRV* de pORE02 para generar pJP3050. Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas cordata* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV (una versión algo modificada de pJP2015 en donde el líder TMV estaba presente corriente debajo del promotor y corriente arriba del gen) antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Sacl* tratado con polimerasa de ADN T4 de pJP3050 para generar pJP3051. Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Smal* de pJP3051 para generar pJP3052. Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Smal* de pORE02 para generar pJP3054. Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas cordata* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Stul* de pJP3054 para generar pJP3055. Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo la  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Sfol* de pJP3056 para generar pJP3056. El fragmento *Pmel-NotI* de pJP3056 se clonó entonces en el sitio *Pmel-NotI* de pJP3051 para generar pJP3057, un vector binario que contiene los cinco genes para la producción de DHA a partir de ALA.

Luego, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo el gen quimérico que codifica el supresor vírico P19 en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Zral* de pJP3057 para generar pJP3059. De forma similar, se clonó un fragmento *Ascl-Pacl* conteniendo el gen quimérico que codifica el supresor vírico V2 en el sitio *Ascl-Pacl* de pJP2015TMV antes de clonar un fragmento *Swal* de este vector conteniendo el casete completo promotor-gen-terminador en el sitio *Zral* de pJP3057 para generar pJP3060.

Se transformaron las tres construcciones en *Arabidopsis* (ecotipo Columbia). Se transformaron las plantas de *Arabidopsis* (ecotipo Col-0) con cada una de las construcciones y se usó pJP3057 para transforma canola. Las semillas T1 se colectarán, se analizarán en medio conteniendo herbicida, y las semillas T2 resultantes se analizarán para cambios morfológicos generales y para la síntesis de LC-PUFA.

Las plantas transformadas (*Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia) que se generaron con las tres construcciones pJP3057, pJP3059 y pJP3060 se autofertilizaron y se colectaron las semillas T1. Estas se sembraron en medio con kanamicina para determinar las características heterocigóticas/homocigóticas de las plantas T1, y las semillas T2 resultantes de cada planta T1 se analizaron para cambios morfológicos generales y síntesis de LC-PUFA (Tabla 18).

Las semillas representativas T2 de las plantas transformadas con pJP3057 contuvieron, en los ácidos grasos totales del aceite de semilla, SDA (0,4 %), ETA (0,6 %), EPA (0,2 %), DPA (0,3 %) y DHA (2,4 %). El aceite de semilla de las plantas T2 también contuvo GLA (1,4 %) y niveles traza de ETrA y ARA. Los coeficientes de conversión en las semillas fueron como sigue: 18,4 % del ALA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -desaturó; 89,7 % del SDA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -elongó; 82,9 % del ETA en la célula se  $\Delta 5$ -desaturó; 93,1 % del EPA en la célula se  $\Delta 5$ -elongó; 88,9 % del DPA en la célula se  $\Delta 4$ -desaturó para producir DHA (Tabla 18).

Las semillas T2 representativas de las plantas transformadas con pJP3059 contuvieron SDA (0,7 %), ETA (0,3 %), EPA (0,2 %), DPA (0,9 %) y DHA (1,3 %). El aceite de semilla también contuvo GLA (0,8 %) y niveles traza de ETrA y ARA. Las eficiencias de conversión fueron como sigue: 15,7 % del ALA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -desaturó; 79,4 % del SDA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -elongó; 88,9 % del ETA en la célula se  $\Delta 5$ -desaturó; 91,7 % del EPA en la célula se  $\Delta 5$ -elongó; 59,1 % del DPA en la célula se  $\Delta 4$ -desaturó para producir DHA (Tabla 18).

**Tabla 18.** Perfiles de ácidos grasos representativos de semillas T2 de *Arabidopsis* transformadas con pJP3057, pJP3059, pJP3060.

Muestra	Columbia	pJP3057	pJP3059	pJP3060
<b>16:0</b>	7,7	7,6	8,3	7,4
<b>16:1d9</b>	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>18:0</b>	3,1	3,7	3,8	3,4
<b>20:0</b>	2,1	1,8	1,8	1,9
<b>22:0</b>	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>24:0</b>	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>18:1d9</b>	12,9	12,8	12,2	13,6
<b>18:1d11</b>	1,5	1,8	1,9	1,6
<b>20:1d11</b>	18,3	16,3	14,7	16,0
<b>20:1 d13</b>	1,7	1,5	2,0	1,9
<b>22:1d13</b>	1,6	1,2	1,2	1,3
<b>24:1d15</b>	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>Otros</b>	2,5	2,3	2,6	2,5
<b>18:2n6</b>	27,8	27,2	28,2	27,9
<b>18:3n6</b>	0,0	1,4	0,8	0,4
<b>20:3n6</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>20:4n6</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>18:3n3</b>	19,7	17,3	18,2	18,2
<b>18:4n3</b>	0,0	0,4	0,7	0,6
<b>20:4n3</b>	0,0	0,6	0,3	0,7
<b>20:5n3</b>	0,0	0,2	0,2	0,3
<b>22:5n3</b>	0,0	0,3	0,9	0,2
<b>22:6n3</b>	0,0	<b>2,4</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>
	100,0	100,0	100,0	100,0

Las semillas T2 representativas de las plantas transformadas con pJP3060 contuvieron SDA (0,6 %), ETA (0,7 %), EPA (0,3 %), DPA (0,2 %) y DHA (1,0 %). El aceite de semilla también contuvo niveles traza de GLA, ETrA y ARA. Las eficiencias de conversión fueron como sigue: 13,3 % del ALA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -desaturó; 78,6 % del SDA que se produjo en la célula se  $\Delta 6$ -elongó; 68,2 % del ETA en la célula se  $\Delta 5$ -desaturó; 80,0 % del EPA en la célula se  $\Delta 5$ -elongó; 83,3 % del DPA en la célula se  $\Delta 4$ -desaturó para producir DHA (Tabla 18).

**Resultados**

Todos los genes de la construcción pJP3057 mostraron alta actividad/alta eficiencia de conversión con la excepción de la  $\Delta 6$ -desaturasa. Esto indica que las  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ -y  $\Delta 4$ -desaturasas estén actuando probablemente sobre sustrato

tipo acil-CoA debido a que el sustrato nativo ALA se produce mediante una acil-PC desaturasa, lo que da como resultado la menor  $\Delta 6$ -desaturación, y los sustratos para las desaturasas transgénicas ETA y DPA se producen mediante elongasas que se sabe que actúan sobre el conjunto de los acil-CoA. Más aun, la alta eficiencia de los pasos de  $\Delta 6$ - y  $\Delta 5$ -elongasa (>80 % de eficiencia) mostraron que las desaturasas inmediatamente precedentes ( $\Delta 6$ - y  $\Delta 5$ -desaturasas, respectivamente) estaban actuando sobre sustratos tipo acil-CoA. Es razonablemente esperable que las actividades de estos genes se incrementen en subsiguientes generaciones de plantas transgénicas cuando se alcanza la característica homocigótica, y que los niveles de los productos LC-PUFA como consecuencia se incrementen.

La presencia del supresor de silenciamiento en las construcciones pJP3057 y pJP3059 incrementó tanto el nivel total de los nuevos ácidos grasos en el aceite de semilla, como el nivel del producto final de la ruta metabólica, DHA.

#### Discusión

Con respecto a los Ejemplos 13 a 15, los ácidos nucleicos exógenos introducidos pueden ser detectados por parte de las plantas como ADN o ARN foráneo llevando a una menor expresión de los mismos debido a los mecanismos de supresión de transgenes mediados por el huésped. Estos mecanismos de supresión pueden tener como objetivos a transgenes a través de la biogénesis de poblaciones de ARN pequeños, y estos ARNs pequeños conducen al aparato de supresión a limitar la expresión del transgén (Matzke et al., 2001). La expresión de transgenes puede estar limitada de diferentes formas incluyendo modificaciones directas del ADN en el sitio de inserción en el cromosoma, tal como mediante metilación, o mediante silenciamiento posterior a la traducción del ARN (Hamilton y Baulcombe, 1999; Voinnet et al., 2003) o a nivel de la proteína (Brodersen et al., 2008). Las características del ADN o ARN foráneo que desencadenan dicho mecanismo de supresión no están bien comprendidas (Lindbo et al., 1993; Lechtenberg et al., 2003). Sin embargo, dicha supresión de la expresión del transgén mediada por el huésped muy posiblemente sea para rasgos que requieren alta expresión, transgenes múltiples y transgenes con regiones de similitud mutua o con el genoma del huésped (Schubert et al., 2004). Más aun, el desempeño de los transgenes se puede degradar en forma progresiva con cada generación subsiguiente, muy probablemente debido a la metilación del ADN del promotor y de las regiones codificantes de transgenes (Hagan et al., 2003).

Aquí los inventores demuestran que las proteínas víricas supresoras (VSP) que se expresan a partir de promotores específicos de semilla luego de la embriogénesis son tolerados por el desarrollo de *Arabidopsis*. La coexpresión de diferentes VSP con una característica cuantificable, como GFP, demostraron que los rasgos recombinantes también fueron tolerados en semillas que expresan VSP (Ejemplo 14). Como se sabe que las VSP bloquean el metabolismo de los ARN pequeños que constituyen el aparato de supresión transgénica, los inventores sugieren que la coexpresión de una VSP junto con rasgos recombinantes en semillas asegurará que estos rasgos se desarrollen a un nivel alto y sin disminución a lo largo de muchas generaciones.

El hecho de que las plantas hayan tolerado la expresión de VSP tales como P19 y PePo luego de la embriogénesis, sugirió que las señales de desarrollo endógenas, al menos las que utilizan ARNs pequeños, son minoritarias o menos críticas en esta etapa tardía del desarrollo de la planta. Las cuatro VSP que se eligieron para este estudio probablemente actúan en diferentes partes de la biogénesis de ARNs pequeños y por lo tanto funcionan en diferentes extensiones. Mediante la reducción del efecto de silenciamiento en casetes transgénicos de múltiples genes a través del uso de una VSP cointroducida, se pueden imaginar varios cambios en las estrategias de expresión transgénicas. Primeramente, los mismos casetes de expresión se pueden usar repetidamente con menos requerimiento para evitar la repetición de secuencias entre secuencias regulatorias o regiones codificantes. Por lo tanto, esta característica puede permitir construir grandes vectores de expresión con múltiples genes usando las mismas señales promotor-poliadenilación. Alternativamente, se pueden usar múltiples copias de un solo gen para incrementar los niveles de expresión con menor probabilidad o extensión de los efectos de silenciamiento que existen, o con mayor estabilidad de expresión a lo largo de las generaciones vegetales.

#### **Ejemplo 16. Expresión transitoria de genes en células de hojas vegetales usando promotores específicos de semilla**

Se demostraron las actividades enzimáticas de las proteínas codificadas por los genes de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 (SEQ ID NO:8 codificada por SEQ ID NO:7),  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:4 codificada por SEQ ID NO:3),  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:26 codificada por SEQ ID NO:25),  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas* CS-0140 (SEQ ID NO:6 codificada por SEQ ID NO:5) y  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:73 codificada por SEQ ID NO:72), cada una bajo el control de promotores específicos de semilla, en tejido de hoja, *in planta*, usando un sistema de expresión transitoria mejorado en *Nicotiana benthamiana*, como sigue.

Se introdujo el vector quimérico pJP3057 que se describe en el Ejemplo 15 y que contiene los cinco genes para la biosíntesis de DHA, cada uno bajo el control del promotor de nabo truncado, FP1, en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1. Se generó un vector quimérico, designado como 35S:LEC2, mediante el clonado de un gen optimizado por codón de LEAFY COTYLEDON2 de *Arabidopsis thaliana* (Arath-LEC2) en el sitio EcoRI de 35S:pORE04. Se introdujo la construcción 35S:LEC2 en forma separada en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1. Se mezclaron

5 células transgénicas de cultivos separados de AGL1 ya sea con pJP3057 o con 35S:LEC2 y se infiltró la mezcla en tejido de hoja de plantas de *Nicotiana benthamiana*. Se hicieron crecer las plantas por otros cuatro días luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis por GC de los ácidos grasos totales en los lípidos de hoja, y en las fracciones lipídicas separadas. Esto reveló que estos genes estaban funcionando para producir DHA en *Nicotiana benthamiana* (Tabla 19). El tejido de hoja transformado con estos genes contuvo SDA (1,2 %), ETA (2,0 %), EPA (0,6 %), DPA (1,7 %) y DHA (2,5 %). El tejido de hoja también contuvo GLA (2,4 %) y niveles traza de otros ácidos grasos  $\omega$ 6 de cadena larga.

10 Se introdujeron los vectores quiméricos pJP3115 y pJP3116 (Ejemplo 17) en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1. Se mezclaron células transgénicas de cuatro cultivos separados de AGL1 con uno de pJP3115, pJP3116, 35S:P19 y 35S:LEC2 y se infiltró la mezcla en tejido de hoja de plantas de *Nicotiana benthamiana*. Se hicieron crecer las plantas por otros cuatro días luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis por GC lo que reveló que estos genes estaban funcionando para producir DHA en *Nicotiana benthamiana* (Tabla 19). El tejido de hoja transformado con estos genes contuvo SDA (5,6 %), ETA (1,4 %), EPA (0,2 %), DPA (1,7 %) y DHA (2,4 %).  
15 El tejido de hoja también contuvo niveles traza de ácidos grasos  $\omega$ 6 de cadena larga.

Este experimento confirmó que las construcciones duales pJP3115 y pJP3116 estaban funcionando en combinación para producir DHA en forma tan eficiente como una construcción individual que contiene los ocho genes.

20 **Tabla 19.** Composición de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos totales) de tejido de hoja de *Nicotiana benthamiana* transformado en forma transitoria con diferentes construcciones. Los errores muestran la desviación estándar entre infiltraciones separadas llevadas a cabo por triplicado.

Ácidos grasos usuales	P19 sola	35S:LEC2	pJP3057	pJP3057 + 35S:LEC2
16:0	13,2 ± 0,5	12,8 ± 1,0	13,3 ± 0,1	13,2 ± 0,6
16:1 <sup>Δ3t</sup>	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
16:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	7,6 ± 0,3	8,2 ± 0,4	7,1 ± 0,3	7,5 ± 0,4
18:0	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3
18:1 <sup>Δ9</sup>	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,2
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	12,6 ± 1,1	12,8 ± 0,6	13,8 ± 0,1	12,7 ± 0,4
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	58,3 ± 1,9	56,3 ± 2,6	56,3 ± 0,7	44,8 ± 2,1
20:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1
Otros minoritarios	3,8	4,6	3,9	4,8
<b>Total</b>	<b>99,9</b>	<b>99,6</b>	<b>98,9</b>	<b>88,5</b>
<b>Nuevos PUFA <math>\omega</math>6</b>				
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	–	0,1 ± 0,0	–	2,4 ± 0,1
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	–	–	–	–
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	–	–	–	0,6 ± 0,1
22:5 <sup>Δ4,7,10,13,16</sup>	–	–	–	0,3 ± 0,0
<b>Total</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>3,5</b>
<b>Nuevos PUFA <math>\omega</math>3</b>				
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	–	–	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>	–	–	–	2,0 ± 0,1
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	–	–	–	0,6 ± 0,0
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>	–	–	–	1,7 ± 0,1
<b>22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup></b>	–	–	–	<b>2,5 ± 0,2</b>
<b>Total</b>	–	–	<b>0,9</b>	<b>8,0</b>
<b>Total de nuevos ácidos grasos</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>11,5</b>
<b>Total de ácidos grasos</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

25 *Discusión: Verificación rápida de fallas y validación de construcciones específicas de semillas*

Los experimentos que usan un factor de transcripción, en este caso LEC2, en combinación con un juego apropiado de genes, cada uno bajo el control de un promotor específico de tejido tal como un promotor específico de semilla, mostraron que dichas construcciones se pueden ensayar en un sistema heterólogo, tal como hojas, en donde el promotor específico de tejido normalmente no se expresaría, y siendo predictivos de la expresión en semillas. La

habilidad para expresar en forma transitoria un promotor específico de semilla en una célula de hoja permite una validación rápida del diseño de la construcción. Los experimentos para validar la efectividad de los promotores específicos de semilla, especialmente en un contexto de construcciones de genes múltiples, previamente se basaban en la transformación estable en una planta o cultivo modelo para aceite de semilla, seguida por la generación de líneas de progenie antes de que los análisis fenotípicos pudieran determinar la efectividad de la construcción en la semilla vegetal. El hecho de que los niveles de ácidos grasos que se obtuvieron en *N. benthamiana* fueron similares a los vistos en la transformación estable de *Arabidopsis* con esta misma construcción como se describió en el Ejemplo 15 incrementa la confianza en la aplicabilidad de este ensayo.

#### **Ejemplo 17. Construcciones duales para la biosíntesis de DHA**

Se construyó el vector pJP3115 (Figura 22) como sigue. Primero, se clonó el fragmento *SbfI*-*Apal* del vector pJP101acq (Figura 14) en el sitio *PstI*-*Apal* de pORE03 para dar pJP3011. Luego, se clonó un fragmento *SwaI* conteniendo la  $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO:125) optimizada por codón en un sitio *XhoI* tratado con la polimerasa de ADN T4 en pJP3011 para dar pJP3108. Luego se clonó un fragmento *SwaI* conteniendo la  $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:127) optimizada por codón en un sitio *NotI* tratado con polimerasa de ADN T4 en pJP3108 para dar pJP3109. Se clonó un fragmento *SwaI* conteniendo la  $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas cordata* (SEQ ID NO:126) optimizada por codón en el sitio *SmaI* en pJP3109 para dar pJP3110. Luego se convirtió la construcción de una construcción resistente a BASTA a una construcción resistente a kanamicina, mediante el clonado del fragmento *BsWI*-*AsiSI* de pJP3110 en el sitio *BsWI*-*AsiSI* de pORE04, dando pJP3111. Se clonó un fragmento *NcoI* (tratado con polimerasa de ADN T4)-*SbfI* conteniendo el promotor de nabo truncado FP1 y la  $\Delta 12$ -desaturasa de *Crepis palestina* en el sitio *EcoRV*-*PstI* en pJP3111 para dar pJP3115.

El vector pJP3116 (Figura 23) se construyó como sigue. Primero, se clonó un fragmento *SwaI* conteniendo la  $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas cordata* (SEQ ID NO:128) optimizada por codón en un sitio *XhoI* tratado con polimerasa de ADN T4 en pJP3011 para dar pJP3112. Se clonó un fragmento *SwaI* conteniendo la  $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:129) optimizada por codón en el sitio *SmaI* en pJP3112 para dar pJP3113. Luego se clonó un fragmento *NotI* conteniendo la  $\Delta 15$ -desaturasa de *Perilla frutescens* en el sitio *NotI* en pJP3113 para dar pJP3114. Luego se convirtió la construcción desde una construcción resistente a BASTA a una construcción resistente a higromicina mediante el clonado de un fragmento *XbaI*-*MluI* con un casete de resistencia a higromicina (consistente en el promotor 35S del virus mosaico de coliflor seguido por el gen higromicina B fosfotransferasa interrumpido por el intrón CAT-1 obtenido a partir del vector binario pWVEC8 y el terminador NOS) en el sitio *AvrII*-*MluI* de pJP3114 para dar pJP3116.

Se introdujeron los vectores quiméricos pJP3115 y pJP3116 individualmente en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 y se mezclaron células transgénicas de cultivos de estas con AGL1 transformada con 35S:P19 y se infiltró la mezcla en tejido de hoja de plantas de *Nicotiana benthamiana* en el invernadero. Se hicieron crecer las plantas durante cinco días adicionales luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis por GC lo que reveló que estos genes estaban funcionando para producir DHA en *Nicotiana benthamiana* (Tabla 20). El tejido de hoja transformado con estos genes contuvo SDA (5,6 %), ETA (1,4 %), EPA (0,2 %), DPA (1,7 %) y DHA (2,4 %). El tejido de hoja también contuvo niveles traza de GLA, ETA y ARA. Las eficiencias de conversión fueron como sigue: 98,9 % del ácido oleico en la célula estaba  $\Delta 12$ -desaturado (no significativamente diferente de la muestra control); 95,4 % del LA en la célula estaba  $\Delta 15$ -desaturado; 18,1 % del ALA que se produjo en la célula estaba  $\Delta 6$ -desaturado; 50,4 % del SDA que se produjo en la célula estaba  $\Delta 6$ -elongado; 75,4 % del ETA en la célula estaba  $\Delta 5$ -desaturado; 95,4 % del EPA en la célula estaba  $\Delta 5$ -elongado; 58,5 % del DPA en la célula estaba  $\Delta 4$ -desaturado para producir DHA.

Ambas construcciones se usaron para transformar canola. Las semillas T1 se colectarán y analizarán para cambios morfológicos generales y niveles de síntesis de LC-PUFA.

**Tabla 20.** Composición de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos totales) de tejido de hoja de *Nicotiana benthamiana* transformado en forma transitoria con diferentes construcciones. Los errores denotan la desviación estándar entre infiltraciones separadas llevadas a cabo por triplicado.

Ácidos grasos usuales	P19 solo	35S:LEC2	pJP3115 + pJP3116 + 35S:LEC2
16:0	13,2 ± 0,5	12,8 ± 1,0	16,1 ± 0,1
16:1 <sup><math>\Delta 3t</math></sup>	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1
16:3 <sup><math>\Delta 9,12,15</math></sup>	7,6 ± 0,3	8,2 ± 0,4	6,8 ± 0,1
18:0	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4	3,4 ± 0,0
18:1 <sup><math>\Delta 9</math></sup>	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0
18:2 <sup><math>\Delta 9,12</math></sup>	12,6 ± 1,1	12,8 ± 0,6	2,6 ± 0,1
18:3 <sup><math>\Delta 9,12,15</math></sup>	58,3 ± 1,9	56,3 ± 2,6	51,0 ± 0,1
20:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Otros minoritarios	3,8	4,6	5,7

Total	<b>99,9</b>	<b>99,6</b>	<b>88,3</b>
Nuevos PUFA $\omega$ 6			
18:3 $\Delta_{6,9,12}$	–	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
20:3 $\Delta_{8,11,14}$	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
20:4 $\Delta_{5,8,11,14}$	–	–	–
22:4 $\Delta_{7,10,13,16}$	–	–	–
22:5 $\Delta_{4,7,10,13,16}$	–	–	0,1 $\pm$ 0,0
Total	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>
Nuevos PUFA $\omega$ 3			
18:4 $\Delta_{6,9,12,15}$	–	–	5,6 $\pm$ 0,1
20:4 $\Delta_{8,11,14,17}$	–	–	1,4 $\pm$ 0,1
20:5 $\Delta_{5,8,11,14,17}$	–	–	0,2 $\pm$ 0,0
22:5 $\Delta_{7,10,13,16,19}$	–	–	1,7 $\pm$ 0,0
<b>22:6 <math>\Delta_{4,7,10,13,16,19}</math></b>	–	–	<b>2,4 <math>\pm</math> 0,1</b>
Total	–	–	<b>11,3</b>
Total de nuevos ácidos grasos	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>11,7</b>
Total de ácidos grasos	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

### Discusión

Se diseñaron pJP3115 y pJP3116 para proveer, en combinación, todos los genes para la producción de DHA, o sea que los dos vectores recombinantes se complementan uno al otro para constituir la ruta metabólica. El ácido graso que se produce por la  $\Delta$ 12-desaturasa codificada por pJP3115 se usó como sustrato por parte de la  $\Delta$ 15-desaturasa codificada por pJP3116 que también contiene genes para la subsiguientes  $\Delta$ 6-desaturasa,  $\Delta$ 6-elongasa y  $\Delta$ 5-desaturasa. Sobre el producto de la  $\Delta$ 5-desaturasa, EPA, es en donde actuó la  $\Delta$ 5-elongasa codificada por pJP3115, el producto de la cual se convirtió a DHA mediante la  $\Delta$ 4-desaturasa también codificada por pJP3115. El principio de dividir los transgenes entre dos construcciones, que se usaron para transformar en forma estable plantas separadas, con el subsiguiente cruce de plantas élite para constituir la ruta metabólica completa, circunscribió algunos de los problemas asociados con contener numerosos transgenes en una única construcción, tal como una menor eficiencia de transformación debida al gran tamaño y la menor expresión génica. La combinación de transformaciones estables de estas construcciones, ya sea mediante supertransformación o mediante cruce de las dos líneas transgénicas, resultará en una planta transgénica que contiene el complemento total de los genes que se requieren para la síntesis de DHA.

También se evidenció que la construcción pJP3115 contuvo cuatro genes que se expresaron en un formato invertido, o sea dos genes en una orientación y dos genes en la otra, de modo que los pares de genes se transcribieron de una manera divergente (alejándose uno del otro). En comparación con el diseño invertido que se usó para expresar tres genes en la construcción pJP107 (Ejemplo 8), se concluyó que el agregado de un cuarto gen en este formato no impidió la expresión de los genes.

Fue interesante advertir la relativamente baja eficiencia de la  $\Delta$ 6-elongación (50,4 %) en comparación con otros experimentos que se describieron previamente, lo que probablemente fue debido al hecho de que los genes que codifican las enzimas de los tres pasos previos de desaturación estaban todas expresadas a partir del promotor FP1 mientras que el gen que codifica la  $\Delta$ 6-elongasa estaba dirigido por el promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana*. Se cree que esto causó una diferencia en los tiempos del promotor, en donde el promotor FAE1 se activó luego del promotor FP1. En comparación con experimentos previos en donde la  $\Delta$ 6-elongasa estaba dirigida por el promotor FP1, esto resultó en una mayor acumulación de SDA que luego se eliminó del conjunto metabólico a través de la  $\Delta$ 6-elongasa antes de que sobre el mismo pueda actuar la  $\Delta$ 6-elongasa.

### **Ejemplo 18. Aislamiento y caracterización de un gen que codifica una DGAT2 de microalga**

35 *Síntesis de un gen de longitud completa de DGAT2 de Micromonas pusilla*

Se analizó la secuencia genómica de modelos de proteína filtrados de *Micromonas* CCMP1545 producido por el US Department of Energy Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) con el programa BLASTP usando una posible secuencia de aminoácidos de *Ostreococcus lucimarinus*, No. de Acceso a Genbank XP\_00141576, como secuencia de búsqueda. Este análisis reveló la presencia de una proteína predicha en *Micromonas* CCMP1545 que tenía homología con XP\_00141576. La secuencia proteica predicha de *Micromonas* CCMP1545 se usó para designar y sintetizar una secuencia nucleotídica optimizada por codones que era más apropiada para la expresión en plantas

dicotiledoneas tales como *Brassica napus*. La secuencia nucleotídica de la región codificante de la proteína se da en SEQ ID NO:107. La construcción plasmídica se designó como 0928814\_Mic1545-DGAT2\_pMA. La secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID NO:108. El análisis por BLASTP usando la secuencia de aminoácidos de desaturasa de *Micromonas* CCMP1545 SEQ ID NO:108 como secuencia de búsqueda de otras proteínas en la base de datos del Genbank mostró que la proteína tenía homología con DGATs. El mayor grado de identidad fue de 53 % a lo largo de la longitud completa con la secuencia de aminoácidos de No. de Acceso XP\_002503155, la secuencia de una posible proteína de *Micromonas* RCC299. Este gen contiene un motivo de diacilglicerol aciltransferasa (dominio conservado NCBI pfam03982) entre los aminoácidos 74 y 334.

Se hizo una construcción genética que codifica 35S:Mic1545-DGAT2 codificando la proteína DGAT2 bajo el control del promotor constitutivo 35S mediante la inserción de la región codificante completa de 0928814\_Mic1545-DGAT2\_pMA, contenida en un fragmento *EcoRI*, en 35S-pORE04 (Ejemplo 4, anterior) en el sitio *EcoRI*, generando pJP3128. Este vector quimérico se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 y se mezclaron células transgénicas de cultivos de estas con 35S:P19 AGL1 y se infiltró la mezcla en tejido de hoja de plantas de *Nicotiana benthamiana* en el invernadero. Se hicieron crecer las plantas durante cinco días adicionales luego de la infiltración antes de tomar discos de hoja para análisis de lípidos que revelaron que el gen que codifica DGAT2 estaba funcionando para incrementar los TAG totales en las células de hojas transformadas, con preferencia por ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 21). En particular, el nivel de ácidos grasos poliinsaturados de los TAG en las células transformadas se incrementó al menos 3 veces.

Las personas versadas en el arte apreciarán que se pueden hacer numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se la muestra en las formas de realización específicas sin alejarse del espíritu o alcance de la invención como ampliamente se la describe. Las presentes formas de realización son, por lo tanto, para ser consideradas en todo respecto como ilustrativas y no como restrictivas.

La presente solicitud reivindica prioridad sobre US 61/199.669 presentada el 18 de noviembre de 2008, y US 61/270.710 presentada el 9 de Julio 2009, los contenidos de las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Cualquier mención de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva solamente tiene el propósito de proveer un contexto para la presente invención. No se debe considerar como una admisión de que parte alguna de dicho material forme parte de la base del arte previo o que pertenezca al conocimiento general en el campo relevante a la presente invención como existente antes de la fecha de prioridad de cada una de las reivindicaciones de la presente solicitud.

**Tabla 21.** Efecto de la expresión de la DGAT2 de *Micromonas pusilla* en hoja de *Nicotiana benthamiana*. P19 es el control, DGAT2 también contiene P19. la cantidad total de TAG en el tejido de la hoja se incrementa dos veces cuando se expresa DGAT2 y se favorecen los ácidos grasos poliinsaturados.

	Cantidad en TAG, µg		Perfil de TAG		Cantidad en PL, µg		Perfil de PL		
	P19	DGAT2	P19	DGAT2	P19	DGAT2	P19	DGAT2	
<b>C16:0</b>	0,73	0,86	55,8	32,7	<b>C16:0</b>	26,33	20,37	14,2	14,5
<b>C16:1d7</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C16:1d7</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>16:1d13t</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>16:1d13t</b>	3,40	2,96	1,8	2,1
<b>16:2w6</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>16:2w6</b>	1,60	1,19	0,9	0,8
<b>16:2w4</b>	0,00	0,05	0,0	1,7	<b>16:2w4</b>	1,15	1,00	0,6	0,7
<b>16:3w3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>16:3w3</b>	12,65	9,05	6,8	6,4
<b>C18:0</b>	0,27	0,32	20,7	12,0	<b>C18:0</b>	4,50	3,56	2,4	2,5
<b>C18:1d9</b>	0,00	0,21	0,0	8,0	<b>C18:1d9</b>	1,89	1,82	1,0	1,3
<b>C18:1d11</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C18:1d11</b>	0,85	0,78	0,5	0,6
<b>C18:2n6</b>	0,14	0,68	11,0	25,9	<b>C18:2n6</b>	24,36	16,52	13,2	11,7
<b>C18:3n6</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C18:3n6</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C18:3n3</b>	0,16	0,52	12,5	19,6	<b>C18:3n3</b>	106,38	82,16	57,6	58,4
<b>C20:0</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C20:0</b>	0,59	0,51	0,3	0,4
<b>C18:4n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C18:4n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C20:3n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C20:3n3</b>	0,34	0,00	0,2	0,0
<b>C22:0</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C22:0</b>	0,37	0,37	0,2	0,3
<b>C20:4n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C20:4n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C20:5n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C20:5n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C22:3n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C22:3n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C24:0</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C24:0</b>	0,43	0,41	0,2	0,3
<b>C22:5n6</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C22:5n6</b>	0,00	0,00	0,0	0,0

	Cantidad en TAG, µg		Perfil de TAG			Cantidad en PL, µg		Perfil de PL	
	P19	DGAT2	P19	DGAT2		P19	DGAT2	P19	DGAT2
<b>C22:5n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C22:5n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>C22:6n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0	<b>C22:6n3</b>	0,00	0,00	0,0	0,0
<b>Total de ácidos grasos</b>	<b>26,2</b>	<b>52,7</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>TFA</b>	<b>3696,9</b>	<b>2814,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
<b>(µg/g Si FW)</b>					<b>(µg/g Si FW)</b>				

**Referencias**

5 Abbadi et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.  
 Abbott et al. (1998) *Science* 282:2012-2018.  
 Abdullah et al. (1986) *Biotech.* 4:1087.  
 Agaba et al. (2004) *Marine Biotechnol. (NY)* 6:251-261.  
 Al-Mariri et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:1915-1923.  
 Alvarez et al. (2000) *Theor Appl Genet* 100:319-327.  
 10 Bates et al. (2007) *J. Biol. Chem. Vol.* 282:31206-31216.  
 Baumberger et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1609-1614.  
 Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.  
 Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.  
 Beaudoin et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6421-6426.  
 15 Beclin et al. (2002) *Curr. Biol.* 12:684-688.  
 Berberich. et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.  
 Bligh and Dyer (1959) *Canadian J. Biochem.* 37: 911-917.  
 Bortolamiol et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1615-1621.  
 Bouvier-Nave et al. (2000) *Euro. J. Biochem.* 267:85-96.  
 20 Brodersen et al. (2008) *Science* 320:1185-1190.  
 Broothaerts et al. (2005) *Nature* 433:629-633.  
 Brosnan et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 104:14741-14746.  
 Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.  
 Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.  
 25 Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.  
 Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.  
 Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.  
 Chikwamba et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11127-11132.  
 Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.  
 30 Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.  
 Chung et al. (2006) *BMC Genomics* 7:120.  
 Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.  
 Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-43.  
 Courvalin et al (1995) *Life Sci.* 318:1209-1212.  
 35 Coutu et al. (2007) *Transgenic Res.* 16: 771-781.  
 Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.  
 Darji et al. (1997) *Cell* 91:765-775.  
 Denic and Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.  
 Dietrich et al. (1998) *Nature Biotech.* 18:181-185.  
 40 Dietrich et al. (2001) *Vaccine* 19:2506.  
 Ding and Voinnet (2007) *Cell* 130:413-426.  
 Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.  
 Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.  
 Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 389: 483-490.  
 45 Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.  
 Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.  
 Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.  
 Fennelly et al. (1999) *J. Immunol.* 162:1603-1610.  
 Fraser et al. (2004) *Plant Physiol.* 135:859-866.  
 50 Fuji et al. (2007) *Plant Cell* 19:597-609.  
 Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.  
 Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.  
 Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.  
 Gleave (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:1203-1207.  
 55 Glevin et al (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.  
 Glick et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 105:157-161.  
 Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.

- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.  
 Guillard and Rythers (1962) *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.  
 Grillot-Courvalin et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:862-866.  
 Grillot-Courvalin (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10:477-481.  
 5 Hagan et al. (2003) *Plant. Biotech. J.* 1:479-490.  
 Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286:950-952.  
 Harayama (1998). *Trends Biotechnol.* 16: 76-82.  
 Hastings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.  
 Hense et al. (2001) *Cell Microbiol.* 3:599-609.  
 10 Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.  
 Hoffmann et al. (2008) *J Biol. Chem.* 283:22352-22362.  
 Hong et al. (2002a) *Lipids* 37:863-868.  
 Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.  
 Horvath et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1914-1919.  
 15 Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.  
 Huang et al. (2004) *Biochimie* 86(11): 793-8.  
 Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.  
 Johansen and Carrington (2001) *Plant Physiol.* 126-930-938.  
 Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol. Biol.* 54:335-52.  
 20 Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.  
 Kapila et al. (1997) *Plant Sci.* 122:101-108.  
 Kasschau et al. (2003) *Devel. Cell* 4:205-217.  
 Khozin et al. (1997) *Plant Physiol.* 114:223-230.  
 Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.  
 25 Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.  
 Kunik et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1871-1876.  
 Lacroix et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 15429-15434.  
 Lazo et al. (1991) *Biotechnol.* 9:693-697.  
 Lechtenberg et al. (2003) *Plant J.* 507-517.  
 30 Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.  
 Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.  
 Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.  
 Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.  
 Lindbo et al. (1993) *Plant Cell* 5:1749-1759.  
 35 Lo et al. (2003) *Genome Res.* 13:455-466.  
 Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.  
 Mallory et al (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.  
 Marillonnet et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23:718-723.  
 Matzke et al. (2001) *Science* 293:1080-1083.  
 40 Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.  
 Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.  
 Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.  
 Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.  
 Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.  
 45 Moreau e al. (1998) *Progress Lip. Res.* 37:371-391.  
 Napier (2007) *Ann. Rev. Plant. Biol.* 58:295-319.  
 Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.  
 Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.  
 Niedz et al (1995) *Plant Cell Reports* 14:403.  
 50 Nishizawa et al. (2003) *Plant J.* 34:647-659.  
 Ohlrogge and Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970.  
 Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859.  
 Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.  
 Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.  
 55 Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.  
 Perrin et al. (2000) *Mol Breed* 6:345-352.  
 Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol – Plant* 40:1-22.  
 Prasher et al (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:31-36.  
 Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.  
 60 Qi et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22: 739-745.  
 Qiu et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.  
 Reddy and Thomas (1996) *Nat. Biotech.* 14:639-642.  
 Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.  
 Robert et al. (2005) *Func. Plant Biol.* 32:473-479.  
 65 Robert et al. (2009) *Marine Biotech* 11:410-418.  
 Rose et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:1628-1635.

- Saha et al. (2006) *Plant Physiol.* 141:1533-1543.  
 Saito et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.  
 Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.  
 Sato et al. (2004) *Crop Sci.* 44: 646-652.  
 5 Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.  
 Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.  
 Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.  
 Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.  
 Schaffner et al (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:2163-2167.  
 10 Schubert et al. (2004) *Plant Cell* 16:2561-2572.  
 Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.  
 Sizemore et al (1995) *Science* 270:299-302.  
 Shianu et al (2001) *Vaccine* 19:3947-3956.  
 Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.  
 15 Sperling et al. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 388:293-8.  
 Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.  
 Spsychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.  
 Stalker et al (1998) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314.  
 Thillet et al (1988) *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.  
 20 Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.  
 Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.  
 Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.  
 Tvrđik (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.  
 Tzfira & Citovsky (2006) *Curr. Opin. Biotech.* 17:147-154.  
 25 Voinnet et al., (2003) *Plant J.* 33:949-956.  
 Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103.  
 Wallis and Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.  
 Watts and Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.  
 Weiss et al (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95:106.  
 30 Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.  
 Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.  
 Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.  
 Yu et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 104:8924-8929.  
 Zank et al. (2002) *Plant J.* 31:255-268.  
 35 Zank et al. (2005) *WO* 2005/012316  
 Zhang et al. (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.  
 Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.  
 Zhang et al. (2007) *Yeast* 25: 21-27.  
 Zhou et al. (2006) *Plant Sci.* 170: 665-673.  
 40 Zhou et al. (2007) *Phytochem.* 68:785-796.  
 Zipfel et al. (2006) *Cell* 125:749-760.

#### Listado de secuencias

- 45 <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation  
 <120> Enzimas y métodos para producir ácidos grasos omega-3  
 <130> 508730  
 50 <150> US 61/199.669  
 <151> 18-11-2008  
 <150> US 61/270.710  
 55 <151> 09-07-2009  
 <160> 129  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 60 <210> 1  
 <211> 825  
 <212> ADN  
 <213> *Micromonas* CS-0170  
 65 <400> 1

ES 2 644 883 T3

atggctttcc cgcgcgtcgc gaccgctgtc ttcggtatct atgcgtacgt gatgtactgg 60  
 tactccgtcc ccggcgcggg cttoctcgcc gagggcaagc aggacgtcgt ggcggtggatc 120  
 ggcgatctgt ccgtggcgtt ccccgccacc gccacgctcc tgtacctctc catgtgctac 180  
 ttcgggccga agatcatggc caagagggag gcgttcgagc cgaagggggtt catgctgggtg 240  
 tacaacgcgt accagaccgt gttcaacatc atcacgctcg ccatcttcat cgctgagctc 300  
 aaccggctgg gcgtgaaggc gtggggcggc cgctgtcgt ggtccgatcc caacagcttc 360  
 tacatctgcc tcgccatctg gctccactac aacaacaagt acctggagct cctcgacacc 420  
 gtcttcatgg tgctgcgcaa gaagaacaac cagctcagct tctccacat ctaccaccac 480  
 tgctctctca tctggcgtg gtggatgggtg tgcttcgta tcaagaacaa cgactgcac 540  
 gacgcgtact ttggcgctg catgaacgt ggaattcagc tcatcatgta ctctattac 600  
 ctcatggccg cgtgaagat caagtgcccg tggaagcagt acatcaccat ggcgcagatg 660  
 ctccagttcg ccatcgtctt tgcgcacagc tgctacgta tctacgacgg gcactgcccg 720  
 gcgattctgc cgtggctgca gatgttcgtg atgaccaaca tgctgggtgct gttcgggcag 780  
 ttctacgtgc agacgtacac gaagaagaag gtaaaggcca agtaa 825

5 <210> 2  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Micromonas CS-0170

10 <400> 2

ES 2 644 883 T3

Met Ala Phe Pro Ala Val Ala Thr Ala Val Phe Gly Ile Tyr Ala Tyr  
1 5 10 15

Val Met Tyr Trp Tyr Ser Val Pro Gly Ala Gly Phe Leu Ala Glu Gly  
20 25 30

Lys Gln Asp Val Val Ala Trp Ile Gly Asp Leu Ser Val Ala Leu Pro  
35 40 45

Ala Thr Ala Thr Val Leu Tyr Leu Ser Met Cys Tyr Phe Gly Pro Lys  
50 55 60

Ile Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Glu Pro Lys Gly Phe Met Leu Val  
65 70 75 80

Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Val Phe Asn Ile Ile Thr Val Ala Ile Phe  
85 90 95

Ile Ala Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val Lys Ala Trp Gly Gly Arg Leu  
100 105 110

Ser Trp Ser Asp Pro Asn Ser Phe Tyr Ile Cys Leu Ala Ile Trp Leu  
115 120 125

His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe Met Val  
130 135 140

Leu Arg Lys Lys Asn Asn Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His  
145 150 155 160

Cys Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Met Val Cys Phe Val Ile Lys Asn  
165 170 175

Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Cys Met Asn Ala Gly Ile  
180 185 190

His Val Ile Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ala Ala Leu Lys Ile Lys  
195 200 205

Cys Pro Trp Lys Gln Tyr Ile Thr Met Ala Gln Met Leu Gln Phe Ala  
210 215 220

Ile Val Phe Ala His Ser Cys Tyr Val Ile Tyr Asp Gly His Cys Pro  
225 230 235 240

Ala Ile Leu Pro Trp Ser Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met Leu Val

ES 2 644 883 T3

245

250

255

Leu Phe Gly Gln Phe Tyr Val Gln Thr Tyr Thr Lys Lys Lys Val Lys  
 260 265 270

Ala Lys

5 <210> 3  
 <211> 894  
 <212> ADN  
 <213> Pyramimonas CS-0140  
 <400> 3

atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60  
 gtggtagccc ctgcaatddd ctcagctacc gacagcatcg gttggggctct taagcccatt 120  
 agcagcgcga caaaggatct tctctctggt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180  
 ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctgggtgtacc gcaaagtatt cctctgcaca 240  
 gtaaaggggc aagaccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttctct 300  
 attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggettacgt caacaagtac 360  
 tctttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420  
 ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac 480  
 gtaaacaccag tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctcttg tatctggtgg 540  
 atgatcacct acgctgcccc tggcgggtgac gcgtaacttct cggcggcgcct caactcgtgg 600  
 gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgetgcccga ggacgagaag 660  
 accaagcgcga agtacctctg gtggggccgc tacctgacct agatgcagat gttccagttc 720  
 ttcatgaacc tgetccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagttc 780  
 atgcccagc tgetggtggt gtacatggtc acgctgctga tgettctcgg caacttctac 840  
 tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

10

15 <210> 4  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Pyramimonas CS-0140  
 <400> 4

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala  
 1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser  
 20 25 30

ES 2 644 883 T3

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro  
 35 40 45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe  
 50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr  
 65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His  
 85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val  
 100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn  
 115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser  
 130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn  
 145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser  
 165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr  
 180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr  
 195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys  
 210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe  
 225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro  
 245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu  
 260 265 270

ES 2 644 883 T3

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys  
 275 280 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln  
 290 295

5 <210> 5  
 <211> 804  
 <212> ADN  
 <213> Pyramimonas CS-0140

<400> 5

atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat 60  
 gtcgcaaacc cagatattcc tgcattccgag aagggtgctg ettactttat gcaggtcgag 120  
 tattggggggc caacgattgg gaccatoggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg 180  
 attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggg gtacaacttc 240  
 tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcaactgca cccgcctcag 300  
 gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag 360  
 gtgatctggc tgcactaaa caacaagtac gttgagctgc tggacacggt ctteatggtc 420  
 atgogcaaga agtttgacca gctttogtte ctgcacattt accatcatac cctgttgatc 480  
 tggctctggg tegtgggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggetctagc 540  
 gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tegtactatg gccttgccgc gctcggggtg 600  
 aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct 660  
 tcgcactoga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgctg tctggttgcc ttacttgagc 720  
 ctgtgggtga tgggtgaacat gttcgtggtg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag 780  
 agcaagggtg ccaagaagca gtaa 804

10

<210> 6  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Pyramimonas CS-0140

<400> 6

Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr  
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val  
 20 25 30

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr  
 35 40 45

15

ES 2 644 883 T3

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn  
50 55 60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe  
65 70 75 80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser  
85 90 95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr  
100 105 110

Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn  
115 120 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys  
130 135 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile  
145 150 155 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr  
165 170 175

Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr  
180 185 190

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile  
195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile  
210 215 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg  
245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln  
260 265

<210> 7  
<211> 1392  
<212> ADN  
<213> Micromonas CCMP1545

ES 2 644 883 T3

<400> 7

```

atgtgtcctc ctaagaccga tggagatct tctcctagat ctctctcac caggtetaag      60
tcattctgctg aggcctcttga tgctaaggat gcttctaccg ctctggttga tcttaagacc    120
cttgagcctc atgaacttgc tgctacctc gagactagat gggttagggg tgaggatggt      180
gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttgc       240
aacactgggtg ctgatgctac tgaggcttcc aaagaatttc acatgcgtag cctcaaggct      300
tggagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag      360
gatgctccta tgcttgagga ttctgctagg tggagagctg aacttgagag ggacggatcc     420
ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcgc       480
cttggaaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttagcgttgt gtacgggtgc     540
ttcttcggag cttagatgtg atgggttcaa catgaggggtg gacacaactc tcttaccgga     600
tctgtgtacg tggataagag acttcagget atgacttgcg gattcggact ttctaccagc     660
ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta ccctcagaa agttagacac      720
gacatggatc ttgataccac tctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat      780
agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttctggt      840
acttctggac ttctcgttca ggctttctgg atctacgttc tccatctag acaggtgctc     900
aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctcaogttgt tagaaccgct     960
gttatcaagc ttgctaccgg atactcttgg cctggttgett actggtggtt cactttcgga    1020
aactggatcg cttacatgta cctcttcgct cacttctcta cttctcacac tcacctccct    1080
gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttactacg ctggtgatca caccgttgac     1140
atcgatcctt ctctgggata cgttacttgg cttatgggat accttaactg ccaggttatc    1200
caccatctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc     1260
cctttcgtca agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaaag    1320
gctactttca gcaacctcga caaagttgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag     1380
aaggctcact ga                                                              1392

```

5 <210> 8  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Micromonas CCMP1545

10 <400> 8

```

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
  1           5           10           15

```

ES 2 644 883 T3

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser  
 20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala  
 35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val  
 50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala  
 65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg  
 85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala  
 100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe  
 115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser  
 130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala  
 145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val  
 165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu  
 180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu  
 195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp  
 210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His  
 225 230 235 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala  
 245 250 255

ES 2 644 883 T3

Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu  
 260 265 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala  
 275 280 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn  
 290 295 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala  
 305 310 315 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp  
 325 330 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe  
 340 345 350

Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu  
 355 360 365

Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser  
 370 375 380

Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile  
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser  
 405 410 415

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val  
 420 425 430

Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys  
 435 440 445

Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His  
 450 455 460

<210> 9  
 <211> 1449  
 <212> ADN  
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

5

<400> 9

ES 2 644 883 T3

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg 60

tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac 120

gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac 180

gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg 240

acggatttta agcatcccgg aggatcgggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg 300

gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg 360

gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgagggc 420

atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc 480

tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg 540

gcgttgatgc acgcgcgctt gcaocgtcgt tcogtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc 600

gcgcgatcgc gttgggtgca gcacgagggg gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg 660

tgggacaagc gaatccaagc ctccgcgcg gggctcggct tggcgtcgag tggcgacatg 720

tggaacaaca tgcacaaca gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat 780

ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgccgcggg 840

ggatcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccggt gacgtccggt 900

atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg caccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc 960

ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggg tatcaaagcc 1020

gtcaccggct actcctggat cgcctcgtac ggcttgctcg cggcgacgat gtgggcgagc 1080

ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc 1140

gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac 1200

aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc 1260

ccggatatgc ctcagttccg ccaaccggaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgccaag 1320

aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc 1380

aacttgaacg acgtcgggaa gcaactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag 1440

tcggcgtga 1449

<210> 10  
 <211> 482  
 <212> PRT  
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 10

Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu  
 1 5 10 15

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val

5

10

ES 2 644 883 T3

			20					25					30			
Thr	Val	Gly	Met	Gly	Ser	Glu	Asp	Ala	Gly	Lys	Lys	Thr	Arg	Asn	Ala	
		35					40					45				
Ser	Val	Thr	Ala	Trp	Thr	Lys	Glu	Leu	Glu	Pro	His	Ala	Ile	Ala	Lys	
	50					55					60					
Thr	Phe	Glu	Arg	Arg	Tyr	Val	Thr	Ile	Glu	Gly	Val	Glu	Tyr	Asp	Val	
65					70					75					80	
Thr	Asp	Phe	Lys	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Tyr	Tyr	Met	Leu	Ser	
				85					90					95		
Asn	Thr	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Ala	Phe	Lys	Glu	Phe	His	Tyr	Arg	
			100					105					110			
Ser	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Val	
		115					120					125				
Asp	Ala	Ala	Thr	Arg	Glu	Pro	Ile	Glu	Asp	Glu	Ala	Met	Leu	Lys	Asp	
	130					135					140					
Phe	Ala	Gln	Trp	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Phe	Lys	Pro	
145					150					155					160	
Ser	Pro	Ala	His	Val	Ala	Tyr	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Met	Phe	
				165					170					175		
Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Leu	Met	His	Ala	Arg	Trp	His	Val	Ala	Ser	Val	
			180					185					190			
Ile	Val	Tyr	Ser	Cys	Phe	Phe	Gly	Ala	Arg	Cys	Gly	Trp	Val	Gln	His	
		195					200					205				
Glu	Gly	Gly	His	Asn	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Ile	Trp	Trp	Asp	Lys	Arg	
	210					215					220					
Ile	Gln	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Asp	Met	
225				230						235					240	
Trp	Asn	Asn	Met	His	Asn	Lys	His	His	Ala	Thr	Pro	Gln	Lys	Val	Arg	
				245					250					255		
His	Asp	Met	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Val	Ala	Phe	Phe	Asn	Ser	
			260					265					270			

ES 2 644 883 T3

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg  
275 280 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe  
290 295 300

Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser  
305 310 315 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala  
325 330 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu  
340 345 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe  
355 360 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu  
370 375 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn  
385 390 395 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile  
405 410 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser  
420 425 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val  
435 440 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp  
450 455 460

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys  
465 470 475 480

Ser Ala

- <210> 11
- <211> 1449
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 644 883 T3

<223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:10

<400> 11

```

atgtgtgttg agactactga ggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct      60
tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat      120
gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctggt actgcttggg ccaaagagct tgagcctcac      180
gctatcgcta agaccttoga gagaagatac gttaccatcg aggggtgttg gtacgatgtg      240
accgatttca aacacocctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactgggtgct      300
gatgctactg aggctttcaa agagtccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt      360
gctgctcttc ctcaacaagc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct      420
atgcttaagg atttcgctca gtggagaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct      480
tctcctgctc atgttgctta ccgttctgct gaactcctg ctatgttctc tottggaacc      540
gctcttatgc atgctagatg gcacgttctc agcgttatcg tgtactctg tttctctgga      600
gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg      660
tgggataaga gaatccaagc tttcgtgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg      720
tggaacaaca tgcacaacaa gcacctgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat      780
cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg      840
ggattctcta agctttggct cagaactcaa gcttgacct tcgttctctg tacctctgga      900
atgggtgctc tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct      960
ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct     1020
gttaccggat actcttggat cgctagetac ggactttctg ctgctactat gtgggcttct     1080
ggatgctacc tttctgctca cttctctact tctcacacce acctcgatgt tgttccatct     1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac     1200
aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttactgcc aggttatcca ccatctcttc     1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgtctag     1320
aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacgggt cttggaaggc tactttcgga     1380
aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctacagagat gaagagcaag     1440
agcgttga                                         1449

```

5

<210> 12

<211> 1329

<212> ADN

10 <213> Pyramimonas CS-0140

<400> 12

ES 2 644 883 T3

atgggaaagg gaggcaatgc tagcgtcct actgccaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60  
aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtgggt cgatcatcaa gtttctctcg 120  
ggttctggtg ctgacgccac cgcttctac cgcgagttcc acgttaggtc agogaaggca 180  
gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240  
gttgagttct ccaagetcaa cccgccctcc ggggagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300  
cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag 360  
gagggttct ttaagccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcacacgga agtcgtggcg 420  
atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga 480  
gttctgatec gcggcattgc acagggcccg tgcggttggc ttatgcacga ggcgggccac 540  
tatagtotta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggatcc 600  
ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca 660  
cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttctc tgatggcttt caacaacgct 720  
gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780  
gccttctct tcttcccctg gacctcctt ctggctggcc tcggttggac caccgtctc 840  
caccocaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggtgctctg 900  
tacgcgagtt tcgtgctct tttctctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960  
tacctcgcca ccttctctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020  
actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggctgtgta ttccggccatc 1080  
cacaccacta acatcaaata cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140  
cagatcgagc atcacctggt cccttcaatg cccagttcc gccacaagat tatctcccgc 1200  
cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260  
gccatggctg acacctcaa gaacttgaat gacgttgcca ctcacgcac tcactccaag 1320  
gcgcaactag 1329

<210> 13  
<211> 442  
<212> PRT  
<213> Pyramimonas CS-0140

<400> 13

Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val  
1 5 10 15

5

10

ES 2 644 883 T3

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly  
 20 25 30  
 Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala  
 35 40 45  
 Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu  
 50 55 60  
 Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala  
 85 90 95  
 Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu  
 100 105 110  
 Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile  
 115 120 125  
 Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val  
 130 135 140  
 Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His  
 165 170 175  
 Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg  
 180 185 190  
 Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp  
 195 200 205  
 Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln  
 210 215 220  
 His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala  
 225 230 235 240  
 Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp  
 245 250 255  
 Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val



# ES 2 644 883 T3

tgtggtgcat cggccatgat tgggggacg gatccttctc caaaaacgcc ctogtcaacg 60  
gcgtcgtcgg acacctcaag cactcgccgc tgcctgtgcc cttttaccgg tgggcgtact 120  
cgcacaagca gcaccacagg tttcacaacc acgaggtagc ggacatgtcg caccctgga 180  
tgtccaagga ggagtacgg gacgtgaacc ccgtcgtgag ggcgctggcg ctggacggtt 240  
ggtggggaac cttcctcggc tttcccgggt acctcctcct ggaaccgcag tgggcggga 300  
cggacgggtg ccacttcaac ccgaactcca ggcctctoga cagggcgccc aaggatgagc 360  
gggtgaagtg cgcggtttcc accgtggcgt gcgcggcgtt tctcggcgcg tcttctgtcg 420  
cgtgcgactc gaaccccggt cactggttcg ctcagtactt ggcgcgtac ttgtgcttct 480  
cgtggtggct cttcaccggt acatacttac agcacaacga cgaggaca 528

<210> 15  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Micromonas CS-0170  
  
<400> 15

5

ES 2 644 883 T3

Trp Cys Ile Gly His Asp Trp Gly His Gly Ser Phe Ser Lys Asn Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Asn Gly Val Val Gly His Leu Thr His Ser Pro Leu Leu Val  
 20 25 30

Pro Phe Tyr Pro Trp Ala Tyr Ser His Lys Gln His His Arg Phe His  
 35 40 45

Asn His Glu Val Arg Asp Met Ser His Pro Trp Met Ser Lys Glu Glu  
 50 55 60

Tyr Ala Asp Val Asn Pro Val Val Arg Ala Leu Ala Leu Asp Gly Trp  
 65 70 75 80

Trp Gly Thr Phe Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Gln  
 85 90 95

Trp Ala Gly Thr Asp Gly Cys His Phe Asn Pro Asn Ser Arg Leu Phe  
 100 105 110

Asp Arg Ala Pro Lys Asp Glu Arg Val Lys Cys Ala Val Ser Thr Val  
 115 120 125

Ala Cys Ala Ala Phe Leu Gly Ala Ser Phe Val Ala Cys Asp Ser Asn  
 130 135 140

Pro Val His Trp Phe Ala Gln Tyr Leu Ala Pro Tyr Leu Cys Phe Ser  
 145 150 155 160

Trp Trp Leu Phe Thr Val Thr Tyr Leu Gln His Asn Asp Glu Asp  
 165 170 175

<210> 16  
 <211> 1461  
 <212> ADN  
 <213> Micromonas RCC299  
 <400> 16

5

ES 2 644 883 T3

atgaccgccg tcggcggcgg gcgtcgacac tcccgcgcgg cgcgtcccga gggactcga 60  
gaccgtcgga agcgtctgtc ggattccaca gagtcggatt ccgtcgtctc ccggacaccc 120  
ggcgacgtac ctcccgcgcg gctcgttcac gcgatgcccg cgatgatgac ctcatccacc 180  
tgtctgcggg ccacgtcgcc ccggatggaa tcgacacgcc ggggtccct ccggtcgtc 240  
gacgccgcgg cgcgccacg caccggcgca tccaagacgg gtcggtcctt ccgcgtcaa 300  
ctccccggg ccatttcgcg gccgacgacg aacctcggaa ccgcggacgc gccaaactcc 360  
gcgcgcggtc ccgtgcgctc cctccgagag ctgcgcgcat ccatcccga ggagtgttc 420  
gagcccagcc tgggggagtc gctcaagtac gccgcgtaag atctcgcgcg gtcgcgcgcg 480  
tgcttcggcg tcctctccc gcacgtggtg gaccaccctt ggctgttacc gctgtacgg 540  
cccctcacgg gcaccgtcat gtggatgaac ttcgtcgtcg gccacgactg cgggcacggc 600  
tccttctcca aatctcctt cgtcaacggc gtcgtcggcc acctcacgca ctgcgcgctg 660  
ctcgtgccct tctaccctg ggcgtaactc cacaagcagc accacagggt tcacaaccac 720  
caggtaaagg acatgtcgca ccggtggatg actgcagag agtacgcga ggtgaacccc 780  
atcgtccggg ctctggcgtc tgacgggtgg tggggaacct tcctcggctt tcccgggtac 840  
ctctcctgg aaccgcggtg ggccgggacg gacgggtgcc acttcaacc acaatccagg 900  
ctcttcgaca gggcgcccaa ggacgagcgg gtgaagtgcg cggtttccac cgtggcgtgc 960  
gcggcgtttc tcggcgcgtc cttcgtcgcg tgcgactcga acccggcgca ctggttcgtc 1020  
cagtaacttg cgcctactt gtgcttctcg tgggtgctct tcaccgtgac ctacctccag 1080  
caccacgact acgacacaac gacgtacgaa gagggccagt gggagtacgt gctggggggt 1140  
ttggagacga tcgaccgca gtttgggac ggcgtggacg agctgacgca tcacatcacc 1200  
gactgccacg tcgcgcacca catgttctcg gacatcccc actaccgct gccgcggcg 1260  
accgccgggg tcgatcggg gctggagccc cgtgggtgtt acaagcgac ggacacgcgg 1320  
gatttcgtga cgaaggtgtt cgagttgcac ggggacgtcg ggcactgctt ggagagcgag 1380  
gcgggggtga ggccgagggc gacgcgcgac gagtgcgcgg cggcgttcaa cggcgaggag 1440  
tggcgcgagg ttgcgaagta g 1461

5 <210> 17  
<211> 486  
<212> PRT  
<213> Micromonas RCC299  
<400> 17

ES 2 644 883 T3

Met Thr Ala Val Gly Gly Gly Arg Arg His Ser Arg Ala Ala Arg Pro  
1 5 10 15

Glu Arg Thr Arg Asp Arg Arg Lys Arg Ser Ser Asp Ser Thr Glu Ser  
20 25 30

Asp Ser Val Val Ser Arg Thr Pro Gly Asp Val Pro Pro Ala Ala Leu  
35 40 45

Val His Ala Met Pro Ala Met Met Thr Ser Ser Thr Cys Leu Arg Ala  
50 55 60

Thr Ser Pro Arg Met Glu Ser Thr Arg Arg Gly Ser Leu Arg Val Val  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ala Pro Ala Arg Thr Gly Ala Ser Lys Thr Gly Arg Ser  
85 90 95

Val Pro Arg Gln Leu Pro Arg Ala Ile Ser Ala Pro Thr Thr Asn Leu  
100 105 110

Gly Thr Ala Asp Ala Pro Thr Pro Ala Ala Gly Pro Val Pro Ser Leu  
115 120 125

Arg Glu Leu Arg Ala Ser Ile Pro Lys Glu Cys Phe Glu Pro Asp Leu  
130 135 140

Gly Glu Ser Leu Lys Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu Ala Ala Leu Ala Ala  
145 150 155 160

Cys Phe Gly Val Ile Ser Pro His Val Val Asp His Pro Trp Leu Leu  
165 170 175

Pro Leu Tyr Ala Pro Leu Thr Gly Thr Val Met Trp Met Asn Phe Val  
180 185 190

Val Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Lys Ser Ser Val Val  
195 200 205

Asn Gly Val Val Gly His Leu Thr His Ser Pro Leu Leu Val Pro Phe  
210 215 220

Tyr Pro Trp Ala Tyr Ser His Lys Gln His His Arg Phe His Asn His



ES 2 644 883 T3

Trp Arg Glu Val Arg Lys  
485

5 <210> 18  
<211> 1461  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:17

<400> 18

```

atgactgctg ttggaggtgg aagaaggcat tctagagctg ctagacctga gagaaccagg      60
gatcgtagaa agagatcttc tgactctacc gagtctgatt ctgtggtttc taggacctct      120
ggtgatgttc ctctgctgc tcttgttcat gctatgctg ctatgatgac ctcttctacc      180
tgccttagag ctacttctcc taggatggaa tctaccagaa ggggatctct cagagttggt      240
gacgctgctg ctccagctag aactggtgct tctaagaccg gaagatctgt tcctagacag      300
ctccctagag ctatctctgc tctactact aaccttgaa ccgctgatgc tctactcct      360
gctgctggac ctgttcttc tcttagagag cttagggcta gcctccctaa agagtgttc      420
gagcctgata ttggagagtc tctcaagtac gctgcttacg atcttgctgc tctcgtgct      480
tgtttcggag ttatctctcc tcaagtgtt gatcctcctt ggcttctccc actttacgct      540
cctcttaccg gaactgtgat gtggatgaac ttcgttgttg gacatgattg cggacacgga      600
tctttctcta agtctagcgt ggtaaacggt gttgttggac accttaccct ctctctctt      660
ctcgttctct tctaccttg ggcttactct cataagcagc accacagatt ccataaccac      720
caggatgaag atatgtctca cccttgatg actgctgagg aatagctga ggtaaccct      780
attgtgaggg ctcttgctct tgatggatgg tggggaactt tccttgatt ccctggatac      840
cttcttcttg agcctagatg ggctggaact gatggatgct acttcaacc ctactctaga      900
cttttcgaca gggctcctaa ggatgaacgt gtaagtggc ctgtttctac tgttgcttgc      960
gctgctttcc ttggagcttc ttcgtggct tgcgattcta acctgctca ttggttcgtct      1020
cagtaacctg ctcttaacct ttgctctct tgggtgctct tcactgttac ttacctcag      1080
caccacgatt acgataccac tacctacgag gaaggacagt gggaatacgt tcttgaggga      1140
ctcgagacta tcgatagaga atttgacac ggtgttgatg agcttactca ccacatcact      1200
gattgtcagc tggctcacca catgttctct gacatgctc attacagact tccagctgct      1260
actgctggtg ttagatctgt tctcagcct agaggactct acaagagaag agacaccagg      1320
gatttcgtta ccaagggtgt cgagcttcat ggtgatgttg gacactgctg tgagtctgaa      1380
gctggtgtta ggctagagc tactagagat gagtgcgctg ctgcttttaa tggatgaagag      1440
tggaggaag ttaggaagtg a      1461
    
```

15

ES 2 644 883 T3

<210> 19  
 <211> 1389  
 <212> ADN  
 <213> Micromonas CCMP1545

5

<400> 19

```

atgacggcgg cgacgacgct ctgcgcgcgc tctccgctcg tcggcgtegg cgcaggcgcc      60
acgtcgaggc gtccggtcga tcgcgcctgc tccgcccgtcg cgacgtcttc ctcgatttcg      120
cgccgcgcgc gcccgctcgc gaccgtccgc gggcgctcca gccgcacgtc gtccctccgcg      180
acgacgacga cgacgacgac gacgcgctcc gctctggcca tggagacccc gtccacgacg      240
acgacggaag cggacgacga cgacgacaag accggcgctcg tcccgctcgt ccgagagctc      300
cgagccgcga tccccgcgga gtgcttcgtc ccgtgctcga gggagtcgat gaagtacgcc      360
gcgatcgacc tcgggtctct cgccgcctgc ttcgggtctgt ggtctccgct cgtgggtgat      420
aaccctgga tgctcccgtc gtacgcccc gtcaccggga cgatcatgtg gatgtgcttc      480
gtcgtcgggc acgactgcgg gcacggcagt ttcaggtcgg tcagttctac aaacgtcgag      540
aacaagtgga tcaacggcgt cgtcggctac ggcacgcact cgccgctcgt cgtgccgttc      600
taccctgga cgactcgc caagcagcac caccggttc ataaccacga ggagaaggac      660
atgtcgcacc cgtggatgag cgcggagcgg tacaaggaca cgaacgcgat cgttcggctc      720
gcgggggcgg gctcggtttc tggtttttgg ttctctcgcg tcgatcacc atggggcgcg      780
tttctcggct tccccggta tctctcttc gagccaaagt ggagcagcac ggaocggctcg      840
cacttcaacc cggccggctc tctgttcgac cgcgccccca aggacgaacg tctcaagtgc      900
gcggtctcga cggtcgcgtg cgcggcgttc ctctctcgcg cgttcgccgc gtgcgacggc      960
cccgcgcagt gggcgacgca gtacctcgcg ccgtatctgt gcttctcgtg gtggctcttc     1020
acggtgacct acctccagca ccacgaccac gacacgaaga cgtacaagga aggcgagtg      1080
gagtaagtct tggggggatt agagacgatc gatcgcgagt tcgggtacgg cgtggacgag     1140
gcgacgcata acatcacgga ctgccacgtc ggcaccaca tgttttcgga catgccgcac     1200
tacaacttgg agaaggccac cgcgggggtg cggggcgtgc tcgagcccag gggactgtat     1260
aagaagaggg acacgagga tttcgcgacg aagatttttg ggttcacaaa agacgtcggg     1320
cactgcgtcg agccggaccg gccgcggcgc acgaaggagg agctcgtgaa ggcgttgggg     1380
cgggagtga                                         1389
    
```

10 <210> 20  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Micromonas CCMP1545

15 <400> 20

ES 2 644 883 T3

Met Thr Ala Ala Thr Thr Leu Ser Arg Ala Ser Ser Val Val Gly Val  
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala Thr Ser Arg Arg Pro Val Asp Arg Ala Val Ser Ala  
 20 25 30

Val Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Ser Arg Arg Ala Arg Arg Val Ala Thr  
 35 40 45

Val Arg Ala Ala Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ala Thr Thr Thr Thr  
 50 55 60

Thr Thr Thr Thr Arg Ser Ala Leu Ala Met Glu Thr Pro Ser Thr Thr  
 65 70 75 80

Thr Thr Asp Ala Asp Asp Asp Asp Asp Lys Thr Gly Val Val Pro Ser  
 85 90 95

Leu Arg Glu Leu Arg Ala Ala Ile Pro Ala Glu Cys Phe Val Pro Cys  
 100 105 110

Leu Arg Glu Ser Met Lys Tyr Ala Ala Ile Asp Leu Gly Leu Leu Ala  
 115 120 125

Ala Cys Phe Gly Leu Trp Ser Pro Leu Val Val Asp Asn Pro Trp Met  
 130 135 140

Leu Pro Leu Tyr Ala Pro Val Thr Gly Thr Ile Met Trp Met Cys Phe  
 145 150 155 160

Val Val Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Arg Cys Val Ser Ser  
 165 170 175

Thr Asn Val Glu Asn Lys Trp Ile Asn Gly Val Val Gly His Ala Thr  
 180 185 190

His Ser Pro Leu Leu Val Pro Phe Tyr Pro Trp Ala Tyr Ser His Lys  
 195 200 205

Gln His His Arg Phe His Asn His Glu Glu Lys Asp Met Ser His Pro  
 210 215 220

ES 2 644 883 T3

Trp Met Ser Ala Glu Arg Tyr Lys Asp Thr Asn Ala Ile Val Arg Cys  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Gly Ser Val Ser Gly Phe Trp Phe Leu Ala Leu Asp His  
 245 250 255

Pro Trp Gly Ala Phe Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro  
 260 265 270

Lys Trp Ser Ser Thr Asp Gly Ser His Phe Asn Pro Ala Gly Arg Leu  
 275 280 285

Phe Asp Arg Ala Pro Lys Asp Glu Arg Leu Lys Cys Ala Val Ser Thr  
 290 295 300

Val Ala Cys Ala Ala Phe Leu Leu Ala Thr Phe Ala Ala Cys Asp Gly  
 305 310 315 320

Pro Ala Gln Trp Ala Thr Gln Tyr Leu Ala Pro Tyr Leu Cys Phe Ser  
 325 330 335

Trp Trp Leu Phe Thr Val Thr Tyr Leu Gln His His Asp His Asp Thr  
 340 345 350

Lys Thr Tyr Lys Glu Gly Glu Trp Glu Tyr Val Leu Gly Gly Leu Glu  
 355 360 365

Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Tyr Gly Val Asp Glu Ala Thr His His  
 370 375 380

Ile Thr Asp Cys His Val Ala His His Met Phe Ser Asp Met Pro His  
 385 390 395 400

Tyr Asn Leu Glu Lys Ala Thr Ala Gly Val Arg Gly Val Leu Glu Pro  
 405 410 415

Arg Gly Leu Tyr Lys Lys Arg Asp Thr Arg Asp Phe Ala Thr Lys Ile  
 420 425 430

Phe Gly Leu His Lys Asp Val Gly His Cys Val Glu Pro Asp Arg Pro  
 435 440 445

Arg Ala Thr Lys Glu Glu Leu Val Lys Ala Leu Gly Arg Glu  
 450 455 460

<210> 21  
 <211> 792  
 <212> ADN  
 <213> Isochrysis galbana

ES 2 644 883 T3

<400> 21

```

atggccctcg caaacgacgc gggagagcgc atctgggagg ctgtgaccga cccggaaatc      60
ctcattggca ctttctcgta cttgctactc aaaccgctgc tccgcaattc cgggctggtg      120
gatgagaaga agggcgcata caggacgtcc atgatctggt acaacgttct gctggcgctc      180
ttctctgcgc tgagctteta cgtgacggcg accgcctctg gctgggacta tggtagggc      240
gcgtggctgc gcaggcaaac cggcgacaca ccgcagccgc tcttcagtg cccgtccccg      300
gtttgggact cgaagctctt cacatggacc gccaaaggcat tctattactc caagtacgtg      360
gagtacctcg acacggcctg gctggtgctc aagggaaga ggggtctcctt tctccaggcc      420
ttccaccact ttggcgcgcc gtgggatgtg tacctcgcca ttcggtgca caacgagggc      480
gtatggatct tcatgttttt caactcgttc attcacacca tcatgtacac ctactacggc      540
ctcaccgccc cgggtataa gttcaaggcc aagccgctca tcaccgcat gcagatctgc      600
cagttcgtgg gcggcttctt gttggtctgg gactacatca acgtccccg cttcaactcg      660
gacaaagga agttgttcag ctgggcttcc aactatgcat acgtcggctc ggtcttcttg      720
ctcttctgcc actttttcta ccaggacaac ttggcaacga agaaatcggc caaggcgggc      780
aagcagctct ag                                                                792

```

- 5 <210> 22
- <211> 263
- <212> PRT
- <213> Isochrysis galbana

10 <400> 22

```

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

```

ES 2 644 883 T3

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

<210> 23  
 <211> 1284  
 <212> ADN  
 <213> *Pavlova salina*

<400> 23

atgggacgcg ggggagacag cagtgggcag ggcgatccgg cggcggagct ggcgggcccg 60  
 agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120  
 aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcaccggg gtggtagcaa ggtcttccgg 180

5

10

ES 2 644 883 T3

atcttccagg accgcatgac gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa ggcgcatc 240  
aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgcccacac gcccttgccc 300  
tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360  
tactacgata catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccagacc 420  
tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggtctcc cgcctctcgg cgccctcatg 480  
gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctccgccaag actatctgca ccaactccgtc 540  
ttcaaggggt ccgtccgacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc 600  
ttcgtgcagg ggtatgagg cgagtgggtg cgcgcggcgc ataacacgca ccacgtgtgc 660  
accaatgagg acggctcggc ccccgacatc aaaacggcgc cgcctgctcat atactgtcgc 720  
aacaagccga gcatcgccaa ggcctgaac gccttcacgc gctaccagca gtactactat 780  
gtgcccgtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcggc 840  
atgcccctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctccgactcg tcgcccacta cggcatcgtc 900  
gcgtgggtct ttgcccggaa ctaccacctg ctcccgcctg tgacggttct ggcggggttt 960  
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020  
gtgcgtcaca tgacgtcgt cgagcagacg gcactcaact cgcgcaacat ctccggcggc 1080  
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcata tcaactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140  
atgatgccc cgggcaacct catgactata cagcccaggg tgcggcctt cttcaagaag 1200  
cacggacttg agtaccgca gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtcgc 1260  
cttgcattcg agcacctgct ttga 1284

<210> 24  
<211> 427  
5 <212> PRT  
<213> *Pavlova salina*  
<400> 24

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu  
1 5 10 15  
Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys  
20 25 30  
Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe  
35 40 45  
Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp  
50 55 60

10

ES 2 644 883 T3

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile  
 65 70 75 80  
  
 Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp  
 85 90 95  
  
 Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met  
 100 105 110  
  
 Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp  
 115 120 125  
  
 Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met  
 130 135 140  
  
 Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met  
 145 150 155 160  
  
 Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu  
 165 170 175  
  
 His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn  
 180 185 190  
  
 Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu  
 195 200 205  
  
 Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp  
 210 215 220  
  
 Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg  
 225 230 235 240  
  
 Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln  
 245 250 255  
  
 Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg  
 260 265 270  
  
 Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro  
 275 280 285  
  
 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe  
 290 295 300

ES 2 644 883 T3

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe  
305 310 315 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu  
325 330 335

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu  
340 345 350

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly  
355 360 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr  
370 375 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys  
385 390 395 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln  
405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu  
420 425

<210> 25  
<211> 1278  
<212> ADN  
<213> *Pavlova salina*

5

<400> 25

atgccgccgc gcatagcta ctgtaagcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60  
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctogtcatcg gtgaccgccg gtacgacgtg 120  
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180  
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggctctgcca aggcggacaa gatgetcaag 240  
tcgctgcctt cgcgccgggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300  
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag ggggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360  
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gogatgcacg tggccggccg cgcgctcatc 420  
tggcacgggt acaccttgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480  
tggctcatgc acgagggcgg ccaactactc ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540  
atccaagtgc cgtgctaagg ccttggetgc ggcattgtgg ggcgctgggt ggcgaaccag 600  
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660

10

ES 2 644 883 T3

ccgctcgtag ccttccacga ggggatagcc gccaaagtga agagccccgc gatgaaggcg 720  
 tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgag ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780  
 tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840  
 atgctcgga ttcgctacgg ccttgctggc tacctcgagg cgaactacgg cgcggggtag 900  
 gtgctcgct gctacctgct gtacgtgcag ctgggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960  
 gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcaccgaac gtgggtggag 1020  
 tacgccgga accacacgac caactgctcg cctcgtggt ggtgcgactg gtggatgctg 1080  
 tacctcaact accagatcga gcaccacctc taccgctcca tgccgcagtt cggccaccgg 1140  
 aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcagc gctgcacta cgacgtgctg 1200  
 ggtacttcg aggccatggc ggacacggtt gccaaccttg acaacgctgc gcacgcgccc 1260  
 gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 26  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 26

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val  
 20 25 30  
 Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro  
 35 40 45  
 Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala  
 50 55 60  
 Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala  
 85 90 95  
 Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu  
 100 105 110  
 Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu  
 115 120 125

10

ES 2 644 883 T3

Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr  
130 135 140

Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly  
145 150 155 160

Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala  
165 170 175

Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met  
180 185 190

Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro  
195 200 205

Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala  
210 215 220

Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala  
225 230 235 240

Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu  
245 250 255

Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg  
260 265 270

Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu  
275 280 285

Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys  
290 295 300

Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe  
305 310 315 320

Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala  
325 330 335

Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser  
340 345 350

Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His  
355 360 365

ES 2 644 883 T3

His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro  
 370 375 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg  
 385 390 395 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val  
 405 410 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln  
 420 425

<210> 27

<211> 801

5 <212> ADN

<213> *Emiliana huxleyi* CCMP1516

<400> 27

```

atgctcgatc ggcctcgtc cgacgcggcc atctggtctg cgggtgccga tccgaaaatc      60
ctgatcggca cttctccta cctgctgctc aagccgctgc tacgcaactc agggctcgtg      120
gacgagcgga aaggcgcta ccggacctcg atgatctggt acaacgtggt gctcgcgctc      180
ttctccgcca cgagcttcta cgtgactgcg accgcgctcg ggtgggacaa gggcacccgc      240
gagtggctcc gcagtctcac gggcgacagc ccgcagcagc tgtggcaatg cccgtcgagg      300
gtatgggact ccaagctggt cctgtggacg gccaaaggcct tctactactc aaagtacgtg      360
gagtacctcg acacggcgtg gctcgtcctc aagggaaga aggtctcctt cctgcagggc      420
ttccaccact ttggcgcgcc gtgggacgtg tacctgggca ttgggtgaa gaacgagggc      480
gtgtggatct tcatgttctt caactcgttc atccacacgg tcatgtacac gtactacggc      540
ctcaccgcgg cgggctacaa gatccgcggc aagccgatca tcaccgcgat gcaaataage      600
cagttcgtcg gcgctttgt cctagtgtgg gactacatca acgtgccgtg cttccacgcc      660
gacgccgggc aggtcttcag ctgggtcttt aactatgctt acgtcggctc cgtctttctg      720
ctgtttctgcc acttcttcta catggacaac atcgcgaagg ccaaggccaa gaaggccgtc      780
gctaccgcga aggcgctgtg a                                          801
    
```

10

<210> 28

<211> 266

15 <212> PRT

<213> *Emiliana huxleyi* CCMP1516

<400> 28

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser  
 1 5 10 15

ES 2 644 883 T3

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 Arg Lys Gly Ala Tyr Arg  
 35 40 45

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

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

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln  
 85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu 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 Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe  
 130 135 140

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

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

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro  
 180 185 190

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

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln  
 210 215 220

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

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala  
 245 250 255

ES 2 644 883 T3

Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu  
 260 265

5 <210> 29  
 <211> 801  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:28

<400> 29

```

atgcttgata gagcttcata tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tctgagatc      60
cttatcggaa ccttctotta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgctg      120
gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt      180
ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt      240
gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg ccttcttaga      300
gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacggt      360
gagtaccttg ataactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccagggg      420
ttccatcatt tcggtgctcc atgggatggt taccttggaa tcaggcttaa gaacgagggg      480
gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga      540
cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaactctc      600
caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct      660
gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggac tgttttcctt      720
cttttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt      780
gctaccagaa aggtcttttg a                                     801
    
```

15 <210> 30  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Ostreococcus tauri*

20 <400> 30

```

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
 1           5           10           15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
          20           25           30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
          35           40           45
    
```

ES 2 644 883 T3

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His  
50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp  
65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg  
85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val  
100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu  
115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg  
130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr  
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly  
165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr  
180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe  
195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His  
210 215 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr  
225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg  
245 250 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro  
260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro  
275 280 285

ES 2 644 883 T3

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu  
 290 295 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe  
 305 310 315 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser  
 325 330 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp  
 340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp  
 355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met  
 370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro  
 385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys  
 405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys  
 420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His  
 435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala  
 450 455

- <210> 31
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Dominio de elongasa de consenso 1
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (2)..(6)
- <223> X = Cualquier aminoácido
  
- <400> 31

ES 2 644 883 T3

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Thr

1

5

5 <210> 32  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 2

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X = cualquier aminoácido

<400> 32

Met Tyr Xaa Tyr Tyr  
 1 5

20 <210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 3

<400> 33

Lys Ile Tyr Glu Phe Val Asp Thr  
 1 5

30 <210> 34  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 4

40 <400> 34

Val His Val Cys Met Tyr Thr  
 1 5

45 <210> 35  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 5

<400> 35

Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr  
 1 5

ES 2 644 883 T3

5 <210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 6  
 <400> 36  
 Met Tyr Ser Tyr Tyr  
 1 5

15 <210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio de desaturasa de consenso 1  
 <400> 37  
 Trp Lys Asn Met His Asn Lys His His Ala  
 1 5 10

25 <210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio de desaturasa de consenso 2  
 <400> 38  
 His His Leu Phe Pro Ser Met Pro  
 1 5

40 <210> 39  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio de desaturasa de consenso 3  
 <400> 39  
 Trp Cys Ile Gly His Asp Cys Gly  
 1 5

50 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Dominio de desaturasa de consenso 4  
 <400> 40

ES 2 644 883 T3

Thr Phe Leu Gln His His Asp Glu Asp Met  
 1 5 10

5 <210> 41  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 41  
 atttaggtga cactatagtt tttttttt tttttv 37

15 <210> 42  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

25 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n= inosina

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> n= inosina

35 <400> 42  
 aagwwcnksg arynsytcga cac 23

40 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> n = inosina

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(3)  
 <223> n = inosina

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> n = inosina

<400> 43  
 annmnrart asgtgtacat 20

<210> 44  
 <211> 21  
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 44	
	gaacaacgac tgcacgacg c	21
10	<210> 45	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 45	
	cgactggagc acgaggacac tga	23
20	<210> 46	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 46	
30	ttgcgacgca ccataaagac ggt	23
	<210> 47	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 47	
40	ggacactgac atggactgaa ggagta	26
	<210> 48	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
50	<400> 48	
	caggcgacgc gcgccagagt cc	22
	<210> 49	
55	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 49	
	ttattagta cttggccttt accttc	26
65	<210> 50	
	<211> 23	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
10	<223> n = inosina	
	<400> 50	
	aaaratmtayg agttygtnga tac	23
	<210> 51	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (3)..(3)	
	<223> n = inosina	
	<400> 51	
	tangtgtaca tgcacacrtg waccc	25
30	<210> 52	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 52	
40	ttcgtggata cgttcatcat gc	22
	<210> 53	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
50	<400> 53	
	agttgagcgc cgccgagaag tac	23
	<210> 54	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
60	<400> 54	
	acctggttga cgttgccctt ca	22
	<210> 55	
65	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 55 gctatggagt tcgctcagcc t	21
10	<210> 56 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 56 ttactactgc ttcttgctgg ccagct	26
20	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 57 artayytsga rytrytgay ac	22
30	<210> 58 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
40	<400> 58 catkarrtar tasgagtaca t	21
45	<210> 59 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 59 catcatccct gttgatctgg tc	22
55	<210> 60 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 60 ccagatcaac agggtatgat ggt	23
65	<210> 61 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 61 cgaaagctgg tcaaacttct tgcgcat	27
	<210> 62	
	<211> 27	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 62 aacatggcgt ctattgcgat tccggct	27
	<210> 63	
	<211> 27	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 63 ttattactgc ttctggcac ccttgct	27
	<210> 64	
	<211> 31	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
40	<222> (23)..(23)	
	<223> n = inosina	
	<400> 64 ggtggaagaa caagcacaac rdncaycayg c	31
45	<210> 65	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<222> (16)..(16)	
	<223> n = inosina	
	<400> 65 gggcatcgtg gggwanarrt grtg	24
60	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 66 agcgagtacc tgcattgggt	20
	<210> 67	
	<211> 27	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 67 atagtgcttg gtgcgcaagc tgtgcct	27
	<210> 68	
	<211> 25	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 68 cacatggga aagggaggca atgct	25
	<210> 69	
	<211> 25	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
35	<400> 69 ttactagtgc gcctggagt gagat	25
	<210> 70	
	<211> 25	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (20)..(20)	
	<223> n = inosina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<222> (23)..(23)	
	<223> n = inosina	
	<400> 70 tgtggtgcat cgccaygan ksngg	25
60	<210> 71	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 644 883 T3

<223> Cebador oligonucleotídico

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (20)..(20)  
 <223> n = inosina

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (26)7 .. (26)  
 <223> n = inosina

<400> 71  
 15 tgcctcgtc gttgtgctgn arrwangt 28

<210> 72  
 <211> 1344  
 <212> ADN  
 20 <213> *Pavlova salina*

<400> 72

atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca 60  
 gattcgtegg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt 120  
 gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcadc cgggtggcgc gcactttgtg 180  
 tcgctgttcc gcggggcgca tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg 240  
 cccaagtcgc gcatgtccgc ctccacgctc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc 300  
 gccgcgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcacgc ccaagatggt gccgtcggtc 360  
 agcagcgggt tcgcgcgggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg 420  
 atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgc tgctcccgtc gatcgtgctc 480  
 ggggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaaacca cggcgcgctc 540  
 tccaagtcgg cctcgggtcaa cctggcgctc ggggttggtcc aggactggat cggcgggagc 600  
 atgacctctt ggetgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac 660  
 aaggaccgag accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc 720  
 ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag 780

ES 2 644 883 T3

ctgctgtttc tcgacatcag cgagctgggt atgtggcggg gggagggcga gcccatcagc 840  
 aagctggcgc ggtacctctt catgcctctg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc 900  
 tttgtcgcgc tgcgcgtgta cctcgcgcgc agcgtgcaca cggcgggtgtg categcggcg 960  
 acggtaatga cggggagctt ctacctcgcc ttctttctct tcctctcgca caacttcgag 1020  
 ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcctccttc 1080  
 ctcaagcggc aggcgcgagc ctcgtccaac gtgggcggcc cgtctctcgc cacgctcaac 1140  
 ggcggcctca actaccaaact cgagcaccac ctcttcccca ggggtgcacca cggcttctac 1200  
 cctcgcctcg cgcggttggc caaggcggag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac 1260  
 taccacacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgagge acatgtacgc gctcggcgcg 1320  
 aggcgcgcga gcaaggcggg gtga 1344

<210> 73  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 73

Met Pro Pro Ser Ala Ala Lys Gln Met Gly Ala Ser Thr Gly Val His  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Val Thr Asp Ser Ser Ala Phe Thr Arg Lys Asp Val Ala Asp  
 20 25 30  
 Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala  
 35 40 45  
 Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly  
 50 55 60  
 Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95  
 Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg  
 100 105 110  
 Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser  
 115 120 125

10

ES 2 644 883 T3

Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu  
 130 135 140

Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu  
 145 150 155 160

Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn  
 165 170 175

His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu  
 180 185 190

Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His  
 195 200 205

Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp  
 210 215 220

Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser  
 225 230 235 240

Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met  
 245 250 255

Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp  
 260 265 270

Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met  
 275 280 285

Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu  
 290 295 300

Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala  
 305 310 315 320

Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser  
 325 330 335

His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr  
 340 345 350

Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser  
 355 360 365

Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn

ES 2 644 883 T3

370

375

380

Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Val His His Gly Phe Tyr  
385 390 395 400

Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile  
405 410 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu  
420 425 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu  
435 440 445

<210> 74

<211> 1563

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 74

5

ES 2 644 883 T3

atggcgattt tggattctgc tggcgttact acgggtgacgg agaacgggtgg cggagagttc 60  
 gtcgatcttg ataggcttcg tcgacggaaa tcgagatcgg attcttctaa cggacttctt 120  
 ctctctgggt cggataataa ttctccttcg gatgatggtg gagctcccgc cgacgtagg 180  
 gatcggattg attcogttgt taacgatgac gctcagggaa cagccaattt ggccggagat 240  
 aataacggtg gtggcgataa taacggtggt ggaagaggcg gcggagaagg aagaggaaac 300  
 gccgatgcta cgtttacgta tcgaccgtcg gttccagctc atcggagggc gagagagagt 360  
 ccacttagct cggacgcaat cttcaaacag agccatgccg gattattcaa cctctgtgta 420  
 gtagttctta ttgctgtaaa cagtagactc atcatcgaaa atcttatgaa gtatggttgg 480  
 ttgatcagaa cggatttctg gtttagttca agatcgctgc gagattggcc gcttttcatg 540  
 tgttgatata ccctttcgat ctttctttg gctgccttta cggttgagaa attggtactt 600  
 cagaaataca tatcagaacc tgttgcctc tttcttcata ttattatcac catgacagag 660  
 gttttgtatc cagtttacgt caccctaagg tgtgattctg cttttttatc aggtgtcact 720  
 ttgatgctcc tcacttgcac tgtgtggcta aagttggttt cttatgctca tactagctat 780  
 gacataagat ccctagccaa tgcagctgat aaggccaatc ctgaagtctc ctactacgtt 840  
 agcttgaaga gcttggcata tttcatggtc gctcccacat tgtgttatca gccaaagttat 900  
 ccacgttctg catgtatacg gaagggttgg gtggctcgtc aatttgcaaa actggtcata 960  
 ttcaccggat tcgatgggatt tataatagaa caatatataa atcctattgt caggaactca 1020  
 aagcatcctt tgaaaggcga tcttctatat gctattgaaa gagtgttgaa gctttcagtt 1080  
 ccaaatttat atgtgtggct ctgcatgttc tactgcttct tccaccttg gttaaacata 1140  
 ttggcagagc ttctctgctt cggggatcgt gaattctaca aagattgggtg gaatgcaaaa 1200  
 agtgtgggag attactggag aatgtggaat atgcctgttc ataaatggat ggttcgacat 1260  
 atatacttcc cgtgcttgcg cagcaagata ccaaagacac tcgccattat cattgctttc 1320  
 ctagtctctg cagtctttca tgagctatgc atcgcagttc cttgtcgtct cttcaageta 1380  
 tgggcttttc ttgggattat gtttcaggtg cctttggtct tcatcacaaa ctatctacag 1440  
 gaaaggtttg gctcaacggg ggggaacatg atcttctggt tcacttctg cattttogga 1500  
 caaccgatgt gtgtgcttct ttattaccac gacctgatga accgaaaagg atcgatgtca 1560  
 tga 1563

<210> 75  
 <211> 520  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 75

5



ES 2 644 883 T3

Ala Val Asn Ser Arg Leu Ile Ile Glu Asn Leu Met Lys Tyr Gly Trp  
145 150 155 160

Leu Ile Arg Thr Asp Phe Trp Phe Ser Ser Arg Ser Leu Arg Asp Trp  
165 170 175

Pro Leu Phe Met Cys Cys Ile Ser Leu Ser Ile Phe Pro Leu Ala Ala  
180 185 190

Phe Thr Val Glu Lys Leu Val Leu Gln Lys Tyr Ile Ser Glu Pro Val  
195 200 205

Val Ile Phe Leu His Ile Ile Ile Thr Met Thr Glu Val Leu Tyr Pro  
210 215 220

Val Tyr Val Thr Leu Arg Cys Asp Ser Ala Phe Leu Ser Gly Val Thr  
225 230 235 240

Leu Met Leu Leu Thr Cys Ile Val Trp Leu Lys Leu Val Ser Tyr Ala  
245 250 255

His Thr Ser Tyr Asp Ile Arg Ser Leu Ala Asn Ala Ala Asp Lys Ala  
260 265 270

Asn Pro Glu Val Ser Tyr Tyr Val Ser Leu Lys Ser Leu Ala Tyr Phe  
275 280 285

Met Val Ala Pro Thr Leu Cys Tyr Gln Pro Ser Tyr Pro Arg Ser Ala  
290 295 300

Cys Ile Arg Lys Gly Trp Val Ala Arg Gln Phe Ala Lys Leu Val Ile  
305 310 315 320

Phe Thr Gly Phe Met Gly Phe Ile Ile Glu Gln Tyr Ile Asn Pro Ile  
325 330 335

Val Arg Asn Ser Lys His Pro Leu Lys Gly Asp Leu Leu Tyr Ala Ile  
340 345 350

Glu Arg Val Leu Lys Leu Ser Val Pro Asn Leu Tyr Val Trp Leu Cys  
355 360 365

Met Phe Tyr Cys Phe Phe His Leu Trp Leu Asn Ile Leu Ala Glu Leu  
370 375 380

ES 2 644 883 T3

Leu Cys Phe Gly Asp Arg Glu Phe Tyr Lys Asp Trp Trp Asn Ala Lys  
 385 390 395 400

Ser Val Gly Asp Tyr Trp Arg Met Trp Asn Met Pro Val His Lys Trp  
 405 410 415

Met Val Arg His Ile Tyr Phe Pro Cys Leu Arg Ser Lys Ile Pro Lys  
 420 425 430

Thr Leu Ala Ile Ile Ile Ala Phe Leu Val Ser Ala Val Phe His Glu  
 435 440 445

Leu Cys Ile Ala Val Pro Cys Arg Leu Phe Lys Leu Trp Ala Phe Leu  
 450 455 460

Gly Ile Met Phe Gln Val Pro Leu Val Phe Ile Thr Asn Tyr Leu Gln  
 465 470 475 480

Glu Arg Phe Gly Ser Thr Val Gly Asn Met Ile Phe Trp Phe Ile Phe  
 485 490 495

Cys Ile Phe Gly Gln Pro Met Cys Val Leu Leu Tyr Tyr His Asp Leu  
 500 505 510

Met Asn Arg Lys Gly Ser Met Ser  
 515 520

5 <210> 76  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 7  
 <400> 76

Val Asp Thr Arg Lys Gly Ala Tyr Arg  
 1 5

15 <210> 77  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Dominio de elongasa de consenso 8  
 <400> 77

Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr

1

5

5 <210> 78  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n es a, c, g o t

<400> 78  
 tggTggacac aaggaagggN gcntaymg 28

25 <210> 79  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 79  
 gtaggtgtac atgatggtrt gdatraa 27

35 <210> 80  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

45 <400> 80  
 gtcctgtctc cagggtctcc acca 24

50 <210> 81  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 81  
 atttagtgta cactatagtt tttttttt ttttt 36

60 <210> 82  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 644 883 T3

	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 82 ttccagaacg agggcatcta cgt	23
	<210> 83 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 83 ttgggtgatc tgcattgacg tgatg	25
	<210> 84 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 84 cgaataacttg aagagcttgt tggaga	26
	<210> 85 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
35	<400> 85 gggctacgag ctggcagatg aagca	25
	<210> 86 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
45	<400> 86 gaaaaaatgg ttgcgccacc catca	25
	<210> 87 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 87 tcactacttc ttcttcttgc cgcggc	27
	<210> 88 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
65		

	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 88 ttccggtact cagcgggtgc g	21
	<210> 89	
	<211> 17	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 89 caggaaacag ctatgac	17
	<210> 90	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 90 acgtagatgc cctcgttctg	20
	<210> 91	
30	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 91 caccgaatgg cgactgaagg gatgcc	26
40	<210> 92	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 92 ctactcggtt ttcctgcggt tgctgga	27
50	<210> 93	
	<211> 819	
	<212> ADN	
	<213> <i>Pavlova pinguis</i>	
55	<400> 93	

ES 2 644 883 T3

atggttgccg caccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg 60  
 ttcgggtgggg aggtgcteta cttctccatt gcctacctgt ttcttgccgc ctttttgaag 120  
 cgcaccccgt tgggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac 180  
 gtgatcatgt gcgtgttctc gctgggtgtgc ttcactctgcc agctcgcage cctgggctat 240  
 gacatgggct acttgcagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt cccctctac 300  
 caggacgtgt ccccgcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtatcc gtctattgcc 360  
 ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctgggtgat gaagggcaag 420  
 cccgtgtcct tgctccaggc cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc 480  
 atcaocttcc agaacgaggg catctaogtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacag 540  
 atcatgtacg catactaogc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagtctgtc 600  
 atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatgggtgta tcaactacac 660  
 accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg 720  
 tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag 780  
 aagaaggccg ctgccgccc gggcaagaag aagaagtag 819

<210> 94  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> *Pavlova pinguis*

5

<400> 94

Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu  
 1                    5                    10                    15  
  
 Lys Asp Ala Val Phe Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Tyr  
                   20                    25                    30

10

ES 2 644 883 T3

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg  
 35 40 45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys  
 50 55 60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr  
 65 70 75 80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile  
 85 90 95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys  
 100 105 110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu  
 115 120 125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu  
 130 135 140

Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly  
 145 150 155 160

Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala  
 165 170 175

Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Gly  
 180 185 190

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln  
 195 200 205

Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr  
 210 215 220

Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala  
 225 230 235 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp  
 245 250 255

Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys  
 260 265 270

<210> 95  
 <211> 840  
 <212> ADN

ES 2 644 883 T3

<213> *Pavlova salina*

<400> 95

atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag 60  
gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttgegett ggtatctgct gctcgagccc 120  
atcctcaagc gctcacggtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgac 180  
gcgtaacaaca tctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg 240  
ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcca cagcgtggtg 300  
cagctctacc aggacgtgag cccatccctt gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360  
gcggtggcgt tccactactc aaagtaactg gagtacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420  
aagggcaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccaact tcggcgccgc gtgggacacc 480  
tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctactctt ttgtgctgct caacgcattc 540  
atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600  
aagccgctga tcacctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660  
cgtacattg acctcggcta cttccgtgcg tcgcccagac tcgtgtggag ctacctgttc 720  
aactatgctg acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac 780  
5 tttagcaagc acaagccaat ctgcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 96

<211> 279

<212> PRT

10 <213> *Pavlova salina*

<400> 96

Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser  
1 5 10 15  
Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser  
20 25 30  
Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val  
35 40 45  
Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile  
50 55 60  
Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala  
65 70 75 80

ES 2 644 883 T3

Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly  
85 90 95

Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe  
100 105 110

Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys  
115 120 125

Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro  
130 135 140

Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr  
145 150 155 160

Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu  
165 170 175

Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr  
180 185 190

Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln  
195 200 205

Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp  
210 215 220

Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe  
225 230 235 240

Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe  
245 250 255

Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser  
260 265 270

Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu  
275

<210> 97

<211> 172

<212> PRT

<213> Virus del enanismo ramificado del tomate

<400> 97

ES 2 644 883 T3

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser  
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu  
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu  
 35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly  
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu  
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn  
 85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Phe Asp Gln Ile Gly Cys Thr Tyr  
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Ile Thr Val Ser Gly Gly Ser Arg  
 115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu  
 130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Ile Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Cys  
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Thr Phe Glu Lys Glu Ser Glu  
 165 170

<210> 98  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Virus de las hojas amarillas rizadas del tomate

<400> 98

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe  
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr  
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val  
 35 40 45

5

10

ES 2 644 883 T3

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe  
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile  
65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr  
85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn  
100 105 110

Val Ser Lys Pro  
115

<210> 99  
<211> 351  
<212> PRT  
<213> Virus de la arruga del nabo

5

<400> 99

Met Glu Asn Asp Pro Arg Val Arg Lys Phe Ala Ser Glu Gly Ala Gln  
1 5 10 15

Trp Ala Ile Lys Trp Gln Lys Lys Gly Trp Ser Ser Leu Thr Ser Arg  
20 25 30

Gln Lys Gln Thr Ala Arg Ala Ala Met Gly Ile Lys Leu Ser Pro Val  
35 40 45

Ala Gln Pro Val Gln Lys Val Thr Arg Leu Ser Ala Pro Val Ala Leu  
50 55 60

Ala Tyr Arg Glu Val Ser Thr Gln Pro Arg Val Ser Thr Ala Arg Asp  
65 70 75 80

Gly Ile Thr Arg Ser Gly Ser Glu Leu Ile Thr Thr Leu Lys Lys Asn  
85 90 95

Thr Asp Thr Glu Pro Lys Tyr Thr Thr Ala Val Leu Asn Pro Ser Glu  
100 105 110

Pro Gly Thr Phe Asn Gln Leu Ile Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Glu Lys  
115 120 125

Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Arg Phe Arg Tyr Ser Pro Met Ser Pro Ser  
130 135 140

10

ES 2 644 883 T3

Thr Thr Gly Gly Lys Val Ala Leu Ala Phe Asp Arg Asp Ala Ala Lys  
145 150 155 160

Pro Pro Pro Asn Asp Leu Ala Ser Leu Tyr Asn Ile Glu Gly Cys Val  
165 170 175

Ser Ser Val Pro Trp Thr Gly Phe Ile Leu Thr Val Pro Thr Asp Ser  
180 185 190

Thr Asp Arg Phe Val Ala Asp Gly Ile Ser Asp Pro Lys Leu Val Asn  
195 200 205

Phe Gly Lys Leu Ile Met Ala Thr Tyr Gly Gln Gly Ala Asn Asp Ala  
210 215 220

Ala Gln Leu Gly Glu Val Arg Val Glu Tyr Thr Val Gln Leu Lys Asn  
225 230 235 240

Arg Thr Gly Ser Thr Ser Asp Ala Gln Ile Gly Asp Phe Ala Gly Val  
245 250 255

Lys Asp Gly Pro Arg Leu Val Ser Trp Ser Lys Thr Lys Gly Thr Ala  
260 265 270

Gly Trp Glu His Asp Cys His Phe Leu Gly Thr Gly Asn Phe Ser Leu  
275 280 285

Thr Leu Phe Tyr Glu Lys Ala Pro Val Ser Gly Leu Glu Asn Ala Asp  
290 295 300

Ala Ser Asp Phe Ser Val Leu Gly Glu Ala Ala Ala Gly Ser Val Gln  
305 310 315 320

Trp Ala Gly Val Lys Val Ala Glu Arg Gly Gln Ser Val Lys Met Val  
325 330 335

Thr Thr Glu Glu Gln Pro Arg Gly Lys Trp Gln Ala Leu Arg Ile  
340 345 350

<210> 100

<211> 303

<212> PRT

<213> Virus del mosaico del guisante

<400> 100

ES 2 644 883 T3

Met His Gly Ile Glu Gln Pro Gln Leu Pro Leu Asp Tyr Val His Arg  
1 5 10 15

Cys Ala Ser Thr Ser Phe Leu Leu Ala Ser Leu Asp Gly Leu Leu Ser  
20 25 30

Glu Ala Arg Glu Leu Ser Gly Pro Leu Ala Leu Ile Thr Ser Ser Tyr  
35 40 45

Tyr Leu Leu Val Ser Ile Ala Leu Cys Trp Ala Ile Pro Gly Ser Phe  
50 55 60

Trp Tyr Arg Pro Gly Cys Trp Leu Gln Pro Val Ser Gly Arg Asn Leu  
65 70 75 80

Ile Phe Cys Gly Pro Thr Glu Ala Leu Gln Arg Phe Arg Leu Tyr Ala  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Leu Val Leu Ser Glu Asn Cys Pro Arg His Gly Gln  
100 105 110

Ser Ala Ala Ile Thr Leu Gln Ser Tyr Trp Ala Leu Pro Asn Asn Ile  
115 120 125

Trp Met Asp Met Ala Gln Leu Asp Leu Leu Thr Phe Ser Met Pro Ile  
130 135 140

Ala Asn Thr Phe Ala Tyr Leu Ala Asp Cys Glu Ala Arg Phe Pro Pro  
145 150 155 160

Ile Val Glu Gly Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Pro Thr Leu Leu Gly  
165 170 175

Leu Thr His Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Leu Ala Leu Arg Arg Arg Asn  
180 185 190

Leu Asp Leu Ser Gly Glu Pro His Arg Val Arg Pro Gly Val Leu Glu  
195 200 205

Ser Met Ala Leu Leu Cys Ser Ser Val Arg Ser Thr Ser Arg Ser Arg  
210 215 220

Gln Ile Pro Pro Leu Tyr Gly Ser Val Leu His His Val Leu Gly Leu  
225 230 235 240

Ala Glu Arg Asp Cys Ile Leu Phe Asp Thr Asp Ser Asn Tyr Ser Ser

ES 2 644 883 T3

245 250 255

Tyr Thr His Arg Val Leu Glu Gln Asp Arg Asn Arg Ala Asp Gln Ser  
 260 265 270

Leu Phe Ser Ile Asp Leu Glu Tyr Val His Asp Leu Glu Leu Ile Ala  
 275 280 285

Leu Gly Tyr Ser Asp Glu Asp Asp Glu Asp Leu Asp Asn Phe Phe  
 290 295 300

5

<210> 101  
 <211> 256  
 <212> PRT  
 <213> Virus del cereal enano amarillo

<400> 101

Met Phe Ile Ala Gln Pro Cys Gly Arg Val Leu Val Phe Asp Val Ala  
 1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Ser Phe Phe Thr Arg Tyr Ser Val Glu Leu Ser Leu  
 20 25 30

Arg Val Leu Asp Pro Phe Phe Thr Arg Ala Val Thr Asp Phe Arg Tyr  
 35 40 45

Thr Gln Asn Glu Ile Asp Leu Phe Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Leu  
 50 55 60

Pro Ile Leu Leu Thr Gly Glu Ser Tyr Ser Trp Arg Gly His Leu Asn  
 65 70 75 80

Leu Pro Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Leu Val Arg Trp Gly Leu Ala Val  
 85 90 95

Gly Tyr Phe Pro Thr Phe Ser Thr Asp Gly Asp Ile Arg Gln Asn Pro  
 100 105 110

Glu Leu Arg Ile Asp Leu Ser Thr Met Ser Thr Arg Ser Phe Tyr Glu  
 115 120 125

Gln Phe Leu Leu Arg Tyr Asn Thr Ser Gly Leu Ala Lys Ala Ile Val  
 130 135 140

Gly Gln Gln Glu Cys Phe Gln Ser Gly Met Glu Ser Phe Lys Arg Phe  
 145 150 155 160

10

ES 2 644 883 T3

Leu His Tyr Arg Leu Thr Cys Phe Glu Ser Cys Leu Pro Arg Pro Arg  
 165 170 175

Trp Glu Ser Pro Leu Ala Pro Gly Pro Tyr Leu Asp Arg Ala Phe Glu  
 180 185 190

Ala Thr Leu Leu Gly Arg Met Val Gly His Asn Gln Leu Leu Phe Thr  
 195 200 205

Gly Leu Ser Ser Asp Ile Thr Arg Tyr Tyr Asn Glu Leu Val Val Glu  
 210 215 220

Gly Val Pro Val Ala Phe Trp Asp Ala Ala Gly Ile Thr Leu His His  
 225 230 235 240

Ala Gly Glu Glu Tyr Phe Ser Asn Ser Tyr Ile Gln Lys Ile Leu Gln  
 245 250 255

<210> 102  
 <211> 519  
 <212> ADN  
 <213> Virus del enanismo ramificado del tomate

5

<400> 102

atggaacgag ctatacaagg aaacgacgct agggaacaag ctaacagtga acgttgggat 60  
 ggaggatcag gaggtaccac ttctcccttc aaacttcctg acgaaagtcc gagttggact 120  
 gagtggcggc tacataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatcccct tggtttcaag 180  
 gaaagctggg gtttcgggaa agttgtatth aagagatata tcagatacga caggacggaa 240  
 gcttcaactgc acagagtcc tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct 300  
 cgatthtttcg gtttcgacca gatcggatgt acctatagta ttcggtttcg aggagttagt 360  
 atcaaccgttt ctggaggggc gcgaactcct cagcatctct gtgagatggc aattcggctc 420  
 aagcaagaac tgctacagct tgcccacaac gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc 480  
 cctgaaggta ctgagacctt cgaaaaagaa agcgagtaa 519

10

<210> 103  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Virus de las hojas amarillas rizadas del tomate

15

<400> 103

ES 2 644 883 T3

atgtgggatc cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgta 60  
gctattaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120  
ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtagct atgtcgaagc gaccaggcga 180  
tataatcatt tccacgcccc cctcgaaggt tcgcgaagg ctgaacttcg acagcccata 240  
cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300  
caggcccatg tacgggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

5 <210> 104  
<211> 1056  
<212> ADN  
<213> Virus de la arruga del nabo

<400> 104

atggaaaatg atcctagagt ccgaaagttc gcacccgagg gcgcccattg ggcgataaag 60  
tggcagaaga agggctggtc atccctaacc agcagacaga aacagaccgc ccgcgcagcg 120  
atggggatca agctctcccc tgtggcgcaa cctgtgcaga aagtgactcg actgagtgtc 180  
ccggtggctc tcgcctaccg cgaggtttcc acccagcctc gggtttctac tgccaggggac 240  
ggcataacca gaagcgggtc tgaactgac acaaccctga agaagaacac tgacactgaa 300  
cctaagtaca ccacagctgt gcttaacca agcgaaccgc gaacattcaa ccaactcacc 360  
aaggaggcgg ccagtatga aaaataccga ttcacgtcac tcagatttag gtaactctccc 420  
atgagccctt caaccaccgc gggcaagggt gctctggcat tcgaccgaga cgctgccaaa 480  
cctccgccc aagacctcgc ttccctctac aacatagagg gttgtgtatc tagcgtgccc 540  
tggacagggg ttatcttgac cgtcccaca gattctactg accgctttgt ggcggatggg 600  
atcagcgatc caaagcttgt caatttcggc aagctcatca tggccaccta tggccaagga 660  
gccaatgatg ccgcccact cgggtgaagt cgagtcgagt acaccgtgca gctcaagaac 720  
agaactggct caaccagcga cgcacagatt ggggacttcg cgggtgttaa ggacggaccc 780  
aggttggctc cgtgggtcaa gaccaaggga acagctgggt gggagcacga ttgtcatttt 840  
ctcggaaccg gaaacttctc gttgacactg ttctacgaga aggcgcccgt ttccggggcta 900  
gaaaacgcag acgcctctga cttctcggtc ctgggagaag ccgcagcagg tagtgtccaa 960  
tgggctggag tgaaggtagc agaaagggga caaagcgtga aaatggtcac aactgaggag 1020  
cagccaaggg gaaaatggca agcactcagg atttag 1056

10 <210> 105  
<211> 912  
<212> ADN  
15 <213> Virus del mosaico del guisante

<400> 105

ES 2 644 883 T3

atgcacggaa ttgagcagcc tcaactaccg ctgattacg ttcaccgttg cgcaccaacc 60  
 tccttcttgc tcgcatcaact agatggcctc ctttctgaag cccgtgaact ctcagggcct 120  
 ctggetctca ttacttctag ctattaacta cttgttteta ttgcoctctg ctgggcaatc 180  
 cctggatcct tctggtatag gcctggctgc tggttgcagc cagtctcagg gcggaatctc 240  
 atcttttgcg gccctaccga ggcccttgcaa cgattccgtc tgtaogetgc cagaacttggg 300  
 ttggtcctgt cagagaactg cccaagacac ggccaatcag cagcaatcac ccttcaatca 360  
 tactggggcac ttctaaciaa catctggatg gacatggccc aattggactt gctcaccttc 420  
 tcaatgcaa ttgctaatac atttgcctac ttggcagatt gtgaagcaag atttctctct 480  
 attgttgaag gagtgggatc tgcttactat gtgccaacgc tgctcggact tactcaccia 540  
 gaccccaggc tttatcttgc gcttcgcagg agaaacctg atcttagtgg cgaacctcat 600  
 agagtctgct ctggtgtcct ggagtctatg gctttgctct gttctagtgt acgtagcaca 660  
 agccgttcca ggcaattcc tcctttatat ggcagcgttt tgcaccacgt tttgggcctg 720  
 gccgagagag actgcatcct ctttgatacg gatagtaact actcctctta cactcatcgg 780  
 gttcttgaac aagaccggaa tcgggctgat cagtcattgt ttagcattga cttggaatat 840  
 gttcatgacc tggagcttat tgcctgggt tactctgatg aagatgatga agatcttgat 900  
 aacttcttct ag 912

<210> 106  
 <211> 771  
 <212> ADN  
 <213> Virus del cereal enano amarillo  
 <400> 106

5

ES 2 644 883 T3

atgttcacg cccaacctg cgggcgagtt cttgtgttcg acgtcgctc cgcacgcca 60  
 tcgttctca ctggttatag tgttgaactc tcgctcctg ttctagacc attcttcacg 120  
 cgagcagtaa cagatttccg atacaccaa aatgaaatcg atttattttg tgtgtctctt 180  
 ggetttctgt tgccaattct cctcacagga gaattctact cttggcgagg tcacctcaac 240  
 ctccccctt cttacaccga attacttggt cgatgggggc tcgcagtggg gtacttcctt 300  
 acctctcca ctgatgggta cattcgacag aaccagaac tccgcacga cctgtccacc 360  
 atgtcaacc gctctttcta cgagcagttc ctactcagat ataacaogag tgggttggca 420  
 aaagctatcg tcggacagca agagtgtttt caaagcggca tggagtcttt taaaagattc 480  
 ctacactacc gctcactgtg ctttgaaagc tgccttccac gacctcgttg ggaaagtctt 540  
 ttggctcctg gtccttatct ggacagggct tttgaggcaa ctcttctcgg ccgatgggtc 600  
 ggtcataacc aactactctt taccggtttg tcttctgata tctactaggta ttataacgag 660  
 ttggttggg aaggcgtgcc ggtggctttt tgggacgctg ccggcattac tttgcacac 720  
 gctggtgaag aatatttttc gaattcttac attcaaaaga ttcttcaatg a 771

5

- <210> 107
- <211> 1005
- <212> ADN
- <213> Micromonas CCMP1545
- <400> 107

ES 2 644 883 T3

atgaccgctg ctccagcttc tgctagagat cctgctcttg ctactggatc tggatctctt 60  
 tacaaccacc tcatgatggt cgcttggtt ggagttgttc atgctggtgt tgctcttgtt 120  
 gctggttgcgt gctacttctt tctctatcct gttgctactt gtgctatcgc tctcgttgct 180  
 cttgctgctc ttactctctg tactactcct catcctgctt ggggacttgc tatcgctaga 240  
 gctatcacta aggtctgctg gagatacttc cctcttacta tggaatggga ggatgagaga 300  
 gcttaccttg acgtctctgc taagggtggt cctgctgtta toggacttga gctcattct 360  
 gttctccctt tgtctatcgt tgctttogga aactacttct tcttcccgga atctacaact 420  
 gagtgctgga gaaactctag agctttggt actggaacca tcttcggttat cctggttctt 480  
 aagcaccttt ggtcttggt tggaatggat gctatctctt ggcgtgctat gaagactctt 540  
 ctgatgatg gaagatctgt tctcatcctc cctgggtggag ttgctgagtg ccttcaaatg 600  
 aggcctggtg ttgagactat ctacctcaag aagaggttcg gattcgtaa gcttctctc 660  
 caaacgggtg cttctcttgt tctctgcttc actttcggac agaccagatc ttactcttac 720  
 tggcgtcttg gacctctctt tgttctcct gttggtgctg aggtttctgc tagagcttgt 780  
 agagttgctc ctatggtttt ctggggaaag tggggatctc ctatccctaa catggttcct 840  
 atgcacactg ttgttgaaa gctatcctt gttagaagc agtctgagcc ttctaacgag 900  
 tacgttcaag agaagctcaa cgagttcgtt gctgctatgg aatctcttta cgttagacac 960  
 aagggaaagc acggatacgc tgagtctact ctggttgttc tttga 1005

<210> 108  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Micromonas CCMP1545

5

<400> 108

Met Thr Ala Ala Pro Ala Ser Ala Arg Asp Pro Ala Leu Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Leu Tyr Asn His Leu Met Met Phe Ala Trp Leu Gly Val  
 20 25 30

Val His Ala Val Val Ala Leu Val Ala Val Ala Cys Tyr Phe Leu Pro  
 35 40 45

10

ES 2 644 883 T3

His Pro Val Ala Thr Cys Ala Ile Ala Leu Val Ala Leu Ala Ala Leu  
 50 55 60

Thr Pro Val Thr Thr Pro His Pro Ala Trp Gly Leu Ala Ile Ala Arg  
 65 70 75 80

Ala Ile Thr Lys Ala Ala Val Arg Tyr Phe Pro Leu Thr Met Glu Trp  
 85 90 95

Glu Asp Glu Arg Ala Tyr Leu Asp Ala Ala Ala Lys Gly Val Pro Ala  
 100 105 110

Val Ile Gly Leu Glu Pro His Ser Val Leu Pro Leu Ser Ile Val Ala  
 115 120 125

Phe Gly Asn Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Ser Thr Pro Glu Cys Val Arg  
 130 135 140

Asn Ser Arg Ala Leu Ala Thr Gly Thr Ile Phe Val Ile Pro Val Leu  
 145 150 155 160

Lys His Leu Trp Ser Trp Leu Gly Met Asp Ala Ile Ser Arg Arg Ala  
 165 170 175

Met Lys Thr Leu Leu Asp Asp Gly Arg Ser Val Leu Ile Ile Pro Gly  
 180 185 190

Gly Val Ala Glu Cys Leu Gln Met Arg Pro Gly Val Glu Thr Ile Tyr  
 195 200 205

Leu Lys Lys Arg Phe Gly Phe Val Lys Leu Ala Ile Gln Thr Gly Ala  
 210 215 220

Ser Leu Val Pro Ala Phe Thr Phe Gly Gln Thr Arg Ser Tyr Ser Tyr  
 225 230 235 240

Trp Arg Leu Gly Pro Pro Leu Val Pro His Val Val Ala Glu Val Phe  
 245 250 255

Ala Arg Ala Cys Arg Val Ala Pro Met Val Phe Trp Gly Lys Trp Gly  
 260 265 270

Ser Pro Ile Pro Asn Met Val Pro Met His Thr Val Val Gly Lys Pro  
 275 280 285

Ile Pro Val Lys Lys Gln Ser Glu Pro Ser Asn Glu Tyr Val Gln Glu

ES 2 644 883 T3

290

295

300

Lys Leu Asn Glu Phe Val Ala Ala Met Glu Ser Leu Tyr Ala Arg His  
 305 310 315 320

Lys Gly Lys His Gly Tyr Ala Glu Ser Thr Leu Val Val Leu  
 325 330

5 <210> 109  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n es a, c, g o t

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(15)  
 <223> n es a, c, g o t

<400> 109  
 angatntatn nnnngt 17

30 <210> 110  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde

<400> 110  
 tgacaggata tattggcggg taaac 25

40 <210> 111  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde

50 <400> 111  
 tggcaggata tattgtgtg taaac 25

55 <210> 112  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
5	<400> 112 tggcaggata tataccgttg taatt	25
	<210> 113 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
15	<400> 113 cggcaggata tattcaattg taatt	25
	<210> 114 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
25	<400> 114 tgtaggata tataccgttg taatt	25
	<210> 115 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
35	<400> 115 tggcaggata tatgtactg taatt	25
	<210> 116 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> y = c o t	
50	<220> <221> misc_feature <222> (3)..(3) <223> r = a o g	
55	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(4) <223> y = c o t	
60	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(14) <223> w = a o t	
65		

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> s = c o g  
 5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n es a, c, g o t  
 10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> v = a, c o g  
 15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> b = c, g o t  
 20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19) .. 19)  
 <223> k = g o t  
 25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> w = a o t  
 30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(25)  
 <223> y = c o t  
 35

<400> 116  
 ygryaggata tatwsnvbkg taawy 25

<210> 117  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde

<400> 117  
 cggcaggata tctctgatg taaat 25

<210> 118  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde

<400> 118  
 tggcaggagt tattcgaggg taaac 25

<210> 119  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 644 883 T3

	<223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
5	<400> 119 tgacaggata tatcgtgatg tcaac	25
	<210> 120 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
15	<400> 120 gggaagtaca tattg'gcggg taaac	25
	<210> 121 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
25	<400> 121 ttacaggata tattaatg tatga	25
	<210> 122 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
35	<400> 122 taacatgata tattcccttg taaat	25
	<210> 123 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
45	<400> 123 tgacaggata tatg'gtaatg taaac	25
	<210> 124 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia del ácido nucleico de transferencia del borde	
55	<400> 124 tggcaggata tataccgatg taaac	25
	<210> 125 <211> 1395 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	
65		

ES 2 644 883 T3

<223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:7

<400> 125

5

```

atgtgtcctc ctaagaccga tgaagatct tctcctagat ctctctcac caggtctaag      60
tcattctgctg aggetottga tgctaaggat gcttctaccg ctctggttga tettaagacc    120
cttgagcctc atgaacttgc tgctaccttc gagactagat gggttagggg tgaggatggt    180
gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttget    240
aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaatttc acatgcgtag cctcaaggct    300
tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag    360
gatgctccta tgcttgagga ttctgctagg tggagagctg aacttgagag ggaaggattc    420
ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcget    480
cttgaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttagcgttgt gtacggtgct    540
ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacacaactc tcttaccgga    600
tctgtgtacg tggataagag acttcaggct atgacttgcg gattcggact ttctaccagc    660
ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcagaa agttagacac    720
gacatggatc ttgataccac tctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat    780
agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttctggt    840
acttotggac ttctcgttca ggctttcttg atctacgttc tccatcctag acaggtgctc    900
aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctacggttgt tagaaccgct    960
gttatcaage ttgctaccgg atactcttgg cctggttgcct actggtgggt cactttcgga   1020
aactggatcg cttacatgta cctcttctgt caottctcta cttctcacac tcacctcct   1080
gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttactacg ctggtgatca caccggtgac   1140
atogatecct ctctgtgata cgttaactgg cttatgggat accttaactg ccaggttatc   1200
caccatctct tcctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc   1260
cctttcgtca agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttgaag   1320
gctactttca gcaacctcga caaagttgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag   1380
aaggctcact gatga                                                    1395

```

<210> 126

<211> 870

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:3

<400> 126

ES 2 644 883 T3

atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct 60  
 gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120  
 tctttctgcta ctaaggatct ccctctcggt gaatctccta ccctcttat cctttctctc 180  
 ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240  
 gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacia cgttttcctt 300  
 atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360  
 tccttctggg gaaacgctta caacctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420  
 ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacacctca tcatgcttct caagggaaac 480  
 gttaaccagg tttccttctt ccattgtttac caccacggat ctatctctgg aatctgggtg 540  
 atgatcaact atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600  
 gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcttaa ggacgaaaag 660  
 accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttacc agatgcaaat gttccagttc 720  
 ttcatagaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcttta ccctaagttc 780  
 attgctcaac tcctogttgt ttacatgggt accctctca tgctttctcg aaacttctac 840  
 tacatgaagc accacgcttc taagtgataa 870

5 <210> 127  
 <211> 1281  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:25  
 <400> 127

ES 2 644 883 T3

atgcctccta gggactotta ctcttacgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaggtt 60  
gacactcctc aagagcaoga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttaogatgtg 120  
accaacttcg ttaagagaca ccttgggtga aagatcattg cttaccaagt gggaaactgat 180  
gctaccgatg cttacaagca gttccatgtg agatctgcta aggctgacaa gatgctcaag 240  
tctctccctt ctagacctgt tcacaaggga tactctccta gaagagctga tcttatcgct 300  
gacttccaag agttcactaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgaacc ttctctccct 360  
catgttgctt accgtcttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctgggtgc tgctcttate 420  
tggcacggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgcgga 480  
tggcttatgc atgaggggtg acactactct cttaccggaa acattgcttt cgatagggct 540  
atccaagttg cttgttacgg acttggatgc ggaatgtctg gtgcttggtg gagaaccag 600  
cataacaagc accatgctac tctcaaaaag ctccagcaog atgttgatct tgataccctc 660  
cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720  
tggctctcca tgcaagctaa actcttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgcctttgga 780  
tggcagcttt accttcacc tagacacatg ctccagaacta agcactacga cgagcttgct 840  
atgcttggta tcagatacgg acttgtggga taccttgcctg ctaactacgg tgctggatac 900  
gttcttgctt getacctct ctacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960  
gctgtttctc aactcatct cctgtttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020  
tacgctgcta accacactac taactgctct ccatcttggg ggtgtgattg gtggatgagc 1080  
tacctcaact accagatcga gcacacctt tacccttcta tgctcagtt caggcatcct 1140  
aagatcgctc ctagagtga gcaactcttc gagaagcaog gacttcaacta cgatgtgcgt 1200  
ggatacttcg aggctatggc tgatacttcc gctaacctcg ataacgttgc tcatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcaatgatg a 1281

5 <210> 128  
<211> 807  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:5  
<400> 128

ES 2 644 883 T3

atggcttcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt gacctacaac 60  
 gtggctaacc ctgatattcc tgcttctgag aaggttccag cttacttcat gcaagtggag 120  
 tactggggac ctactatcgg aactatcggg tacctcctct tcacttactt cggaaagegt 180  
 atcatgcaaa acagaagcca gcctttcggg cttaagaacg ctatgctcgt gtacaacttc 240  
 taccagacct tcttcaacag ctactgcac caccctctcg ttacctctca tagggctcag 300  
 ggacttaaag tttggggaaa catccctgat atgaccgcta actcttgggg aatctctcag 360  
 gttatctggc tccactaaa caacaagtac gtggagcttc tcgatacctt ctccatgggtg 420  
 atgaggaaga agttcgacca gctttctttc ctccacatct accaccacac tcttctcacc 480  
 tggtcatggt tcgtggttat gaagctcgag cctggtggag attgctactt cggatctagc 540  
 gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt 600  
 aactgcttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgcgct 660  
 tctcactcta tctacacgc ttacgttcag aacactgctt tctggcttcc ttaccttcag 720  
 ctctgggtga tggtaacat gttcgtgctc ttcgctaact tctaccgtaa aaggtaacaag 780  
 agcaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

5

<210> 129  
 <211> 1347  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos optimizada por codón para la producción en plantas de SEQ ID NO:72

<400> 129  
 atgcctccat ctgctgctaa acagatggga gcttctactg gtgttcacgc tgggtgttacc 60  
 gattcttctg ctttcaccag aaaggatgtg gctgatagac ctgatcttac catcgttggt 120  
 gactctgtgt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcacc ctgggtggtgc tcatttcggt 180  
 tcactcttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccacag aagagcttgg 240  
 cctaagtcta ggatgtctag gttccatggt ggatctcttg cttctaccga ggaacctggt 300

ES 2 644 883 T3

gctgctgatg agggatacct tcagctttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtg 360  
 tcactctggat tcgctccagc ttcttactgg gttaaggctg gacttatect cggatctgct 420  
 atcgctcttg aggettacat gctctacgct ggaaagagac ttctcccttc tategttctt 480  
 ggatggctct tcgctcttat cggacttaac atccagcatg acgctaacca tggtgctttg 540  
 tctaagtctg ctagcgtaa ccttgcctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600  
 atgatccttt ggctccaaga gcatgttggt atgcaccacc tccacaccaa cgatgttgat 660  
 aaggacctg atcaaaaggc tcatggtgct cttagactca agcctaccga tgcctggta 720  
 cctatgcatt ggcttcagca cctttacctt ctccctggtg aaactatgta cgctttcaag 780  
 ctctcttcc togatatctc tgagcttggt atgtggagat gggaggggta acctatctct 840  
 aagctcgctg gatacctctt catgccttct cttctctca agcttacctt ctgggctaga 900  
 ttctgtgctc ttctcttta cctcgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tategctgct 960  
 actgttatga ccggaagctt ctaccttgc ttcttctct tcctcagcca caacttcgag 1020  
 ggtgttgctt ctgttgacc tgatggatct atcaccteta tgaccagggg agcttcttct 1080  
 cttagaggc aggetgagac ttcttcta atgtggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140  
 ggtggactca actaccaa atcgagcaccac ctttcccta gagttacca cggattctac 1200  
 cctagacttg ctctcttgt gaaggctgaa cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260  
 taccctacca tctggcttaa cctcgcttct acctcagac atatgtacgc tcttggaga 1320  
 aggcctagat ctaaggctga gtgatga 1347

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula recombinante que sintetiza ácido docosapentaenoico (DPA), en donde la célula se deriva de una célula que no es capaz de sintetizar DPA, y en donde la célula recombinante comprende polinucleótidos exógenos que codifican
- i) una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa,
  - ii) una  $\Delta 8$  desaturasa y/o una  $\Delta 6$  desaturasa,
  - iii) una  $\Delta 9$  elongasa y/o una  $\Delta 6$  elongasa,
  - 10 iv) una  $\Delta 5$  desaturasa, y
  - v) opcionalmente, una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,
- en donde cada polinucleótido está unido de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en donde la  $\Delta 5$  elongasa tiene una actividad de ácido eicosapentaenoico (EPA) para producir DPA con una eficacia de al menos el 70 % cuando la elongasa se expresa a partir de un polinucleótido exógeno y en donde la  $\Delta 5$  elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6.
- 15 2. La célula recombinante de la reivindicación 1 que es una célula vegetal o de levadura.
3. La célula recombinante de las reivindicaciones 1 o 2, que es una célula vegetal.
4. La célula recombinante de las reivindicaciones 2 o 3, en la que la planta es una angiosperma.
- 25 5. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una o más de las siguientes características
- i) la célula tiene una capacidad reducida para convertir ácido oleico en ácido eicosenoico (C20:1) cuando se compara con una célula de tipo salvaje, y/o menos del 5 % del ácido oleico se convierte a ácido eicosenoico en la célula,
  - 30 ii) la célula comprende una conversión aumentada de ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) a ácido estearidónico (SDA) y/o ácido araquidónico (ARA) a EPA con respecto a la correspondiente célula que carece de los polinucleótidos exógenos,
  - iii) la cantidad de ácido docosahexanoico (DHA) en los ácidos grasos de la célula es al menos el 3 % de los ácidos grasos totales de la célula, y
  - 35 iv) la eficacia de la conversión de ALA a EPA o DPA es al menos del 17,3 %.
6. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además polinucleótidos exógenos que codifican;
- 40 i) una  $\Delta 17$  desaturasa,
- ii) una  $\Delta 15$  desaturasa, y/o
- iii) una  $\Delta 12$  desaturasa
- 45 en donde cada polinucleótido está unido de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.
7. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que una o más o todas las desaturasas tienen mayor actividad en un sustrato acil-CoA que para el correspondiente sustrato acil-PC.
- 50 8. Un método para sintetizar DPA, comprendiendo el método
- a) introducir en las células que no pueden sintetizar DPA, polinucleótidos exógenos que codifican
- i) una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa, en la que la  $\Delta 5$  elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporcionan en la SEQ ID NO:6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 47 % idéntica a la SEQ ID NO:6,
  - ii) una  $\Delta 8$  desaturasa y/o una  $\Delta 6$  desaturasa,
  - 55 iii) una  $\Delta 9$  elongasa y/o una  $\Delta 6$  elongasa,

- iv) una  $\Delta 5$  desaturasa, y
- v) opcionalmente, una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

5 en donde cada polinucleótido está unido de manera operativa a un promotor que es capaz de dirigir la expresión de dicho polinucleótido en la célula,

- b) expresar los polinucleótidos exógenos en las células, y
- c) seleccionar las células en las que, basado en el análisis de la composición de ácido graso, la  $\Delta 5$  elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos el 70 %, y;
- 10 d) extraer un aceite que comprende DPA de las células seleccionadas.

9. Un organismo transgénico no humano que comprende una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

15 10. El organismo de la reivindicación 9 que es una planta transgénica.

11. Una semilla que comprende la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o que se puede obtener a partir de la planta transgénica de la reivindicación 10.

20 12. Aceite que se puede obtener de una célula vegetal o de una célula de levadura recombinantes que sintetizan DPA, en donde dichas célula vegetal o célula de levadura recombinantes comprenden un polinucleótido exógeno que codifica una elongasa de ácido graso con actividad  $\Delta 5$  elongasa, en donde la elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de al menos un 70 % cuando la elongasa se expresa a partir del polinucleótido exógeno en la célula vegetal o de levadura, de forma que la suma de los porcentajes de DPA y DHA respecto de la suma de los porcentajes de EPA, DPA y DHA en el aceite es al menos el 70 %.

25 13. El aceite de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la célula vegetal es una célula de semilla vegetal madura.

30 14. El aceite de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en el que la planta es una angiosperma.

15. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el aceite se puede obtener por extracción del aceite, en particular a partir de un aceite de semillas.

35 16. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que es aceite purificado.

40 17. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que dicho aceite es aceite de canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), aceite de mostaza (*Brassica juncea*), otros aceites derivados de Brassica, aceite de girasol (*Helianthus annuus*), aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), aceite de soja (*Glycine max*), aceite de cártamo (*Carthamus tinctorius*), aceite de maíz (*Zea mays*), aceite de tabaco (*Nicotiana tabacum*), aceite de cacahuete (*Arachis hypogaea*), aceite de palma, aceite de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*), aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de aguacate (*Persea americana*), aceite de oliva (*Olea europaea*), aceite de casis (*Anacardium occidentale*), aceite de macadamia (*Macadamia intergrifolia*), aceite de almendra (*Prunus amygdalus*) o aceite de semillas de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

45 18. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que la célula vegetal o de levadura comprende polinucleótidos exógenos que codifican:

- i) una  $\Delta 8$  desaturasa y/o una  $\Delta 6$  desaturasa,
- 50 ii) una  $\Delta 9$  elongasa y/o una  $\Delta 6$  elongasa,
- iii) una  $\Delta 5$  desaturasa, y
- iv) opcionalmente una  $\Delta 4$  desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa,

55 en la que cada polinucleótido está unido de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos nucleótidos en la célula.

19. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que dicha célula vegetal o de levadura comprende polinucleótidos exógenos que codifican:

- 60 i) una  $\Delta 117$  desaturasa,
- ii) una  $\Delta 15$  desaturasa, y/o

iii) una  $\Delta 12$  desaturasa

en donde cada polinucleótido está unido de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos nucleótidos en la célula.

5 20. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que dicha célula vegetal o de levadura sintetiza DHA.

10 21. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en donde el aceite se **caracteriza por** una o más de las siguientes propiedades:

- i) al menos el 6 % del total de ácidos grasos incorporados en el triacilglicerol es DPA; y/o
- ii) DPA constituye el 20-65 % del total de SDA, ácido eicosatetraenoico (ETA), EPA y DPA.

15 22. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en donde el aceite se **caracteriza por** una o más de las siguientes propiedades:

- i) la cantidad de DHA en los ácidos grasos es al menos el 3 %, preferentemente al menos el 4 %;
- ii) al menos el 6 % de los ácidos grasos totales incorporados en el triacilglicerol es DPA; y/o
- 20 iii) DHA constituye el 20-65 % del total de SDA, ETA, EPA, DPA y DHA.

23. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en el que el nivel de C20:1 en el aceite es menos del 1 % de los ácidos grasos totales.

25 24. El aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23, en el que los niveles de ácidos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) en el aceite se basa en:

- i) una eficacia de conversión de ALA en EPA, calculado como la suma de porcentajes de EPA, DPA y DHA respecto de la suma de porcentajes de ALA y todos los productos de ácido graso  $\Delta 6$ -desaturada de ALA, de al menos el 17,3 %;
- 30 ii) una eficacia de conversión de ALA en DPA, calculada como la suma de porcentajes de DPA y DHA respecto de la suma de porcentajes de ALA y todos los productos de ácido graso de  $\Delta 6$ -desaturada de ALA, de al menos el 15,4 %;
- 35 iii) una eficacia de conversión de ALA en DHA, calculado como el porcentaje de DHA respecto de la suma de porcentajes de ALA y todos los productos de ácido graso  $\Delta 6$ -desaturados de ALA, de al menos el 9,5 %; y/o
- iv) una eficacia de conversión de EPA en DHA, calculada como el porcentaje de DHA respecto de la suma de porcentajes de EPA y todos los productos de ácido graso de  $\Delta 5$  alargado de EPA, de al menos el 45 %.

40 25. Un método para producir aceite, que comprende tratar el aceite de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24.

45 26. Un método para producir aceite que contiene ácidos grasos insaturados, comprendiendo el método extraer aceite de la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, del organismo transgénico no humano de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y/o de la semilla de la reivindicación 11.

27. El método de las reivindicaciones 8 o 26, en el que el aceite se purifica o se trata adicionalmente.

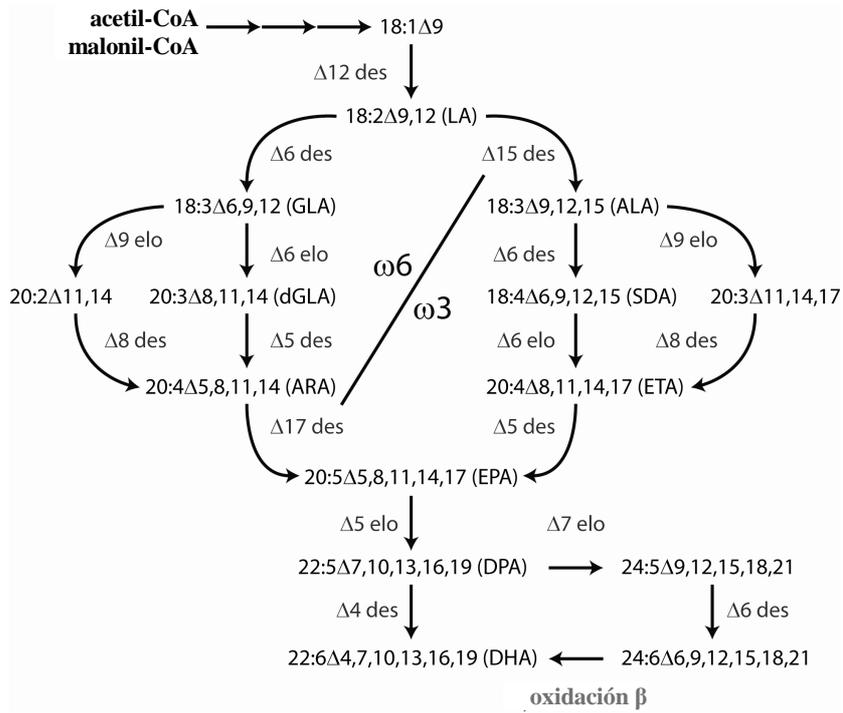
28. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en el que la semilla es una semilla oleaginosa.

50 29. Alimentos, cosméticos o productos químicos que comprenden la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el organismo transgénico no humano de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, la semilla de la reivindicación 11 y/o de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24.

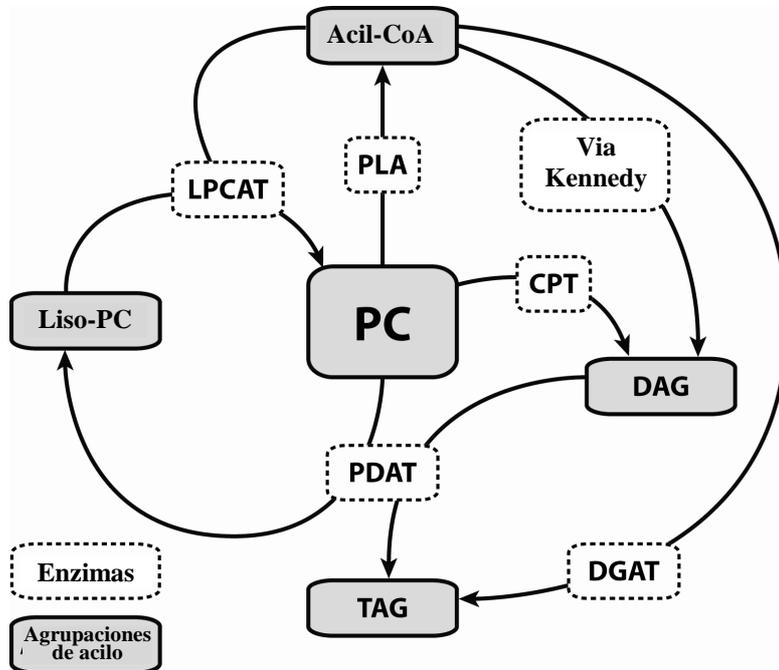
55 30. Uso de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el organismo transgénico no humano de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, la semilla de la reivindicación 11, el aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24 y/o el aceite que se puede obtener usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una dolencia que se beneficiaría de una PUFA.

60 31. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el organismo transgénico no humano de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, la semilla de la reivindicación 11, el aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24 y/o el aceite que se puede obtener usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 para su uso en el tratamiento o la prevención de una dolencia que se beneficiaría de una

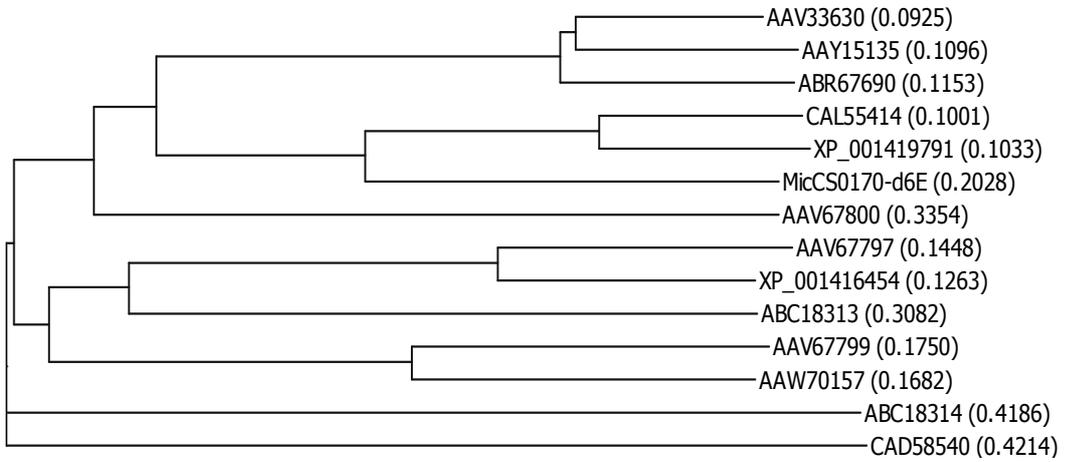
PUFA.



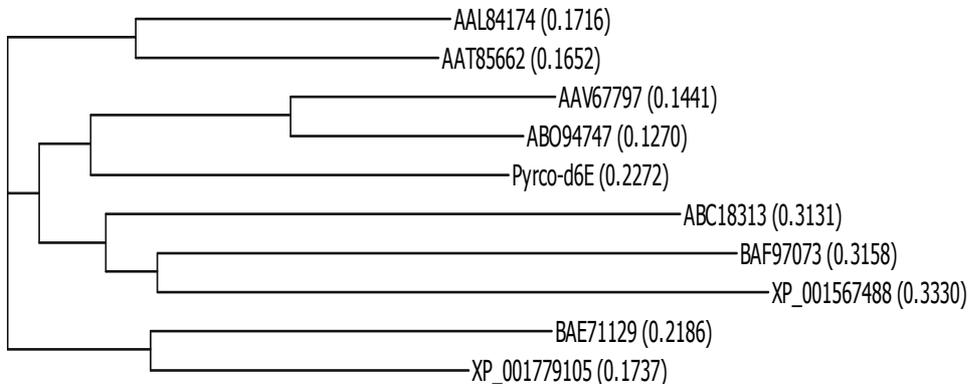
**Figura 1**



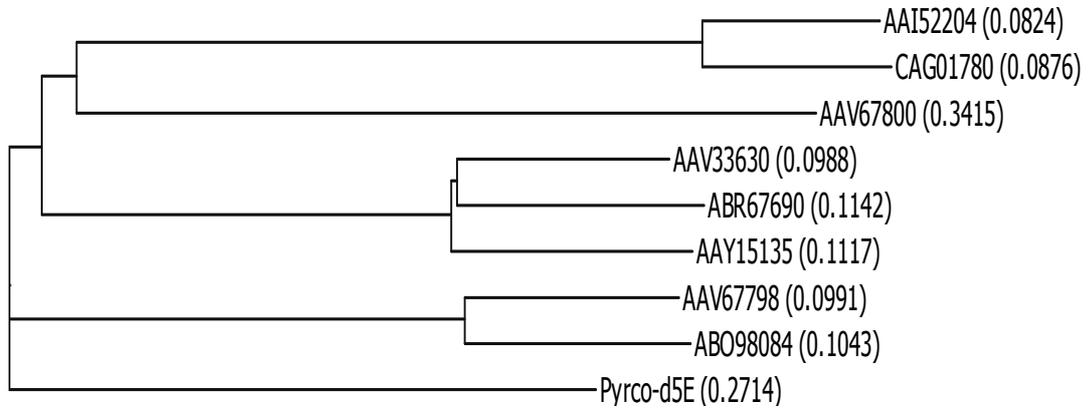
**Figura 2**



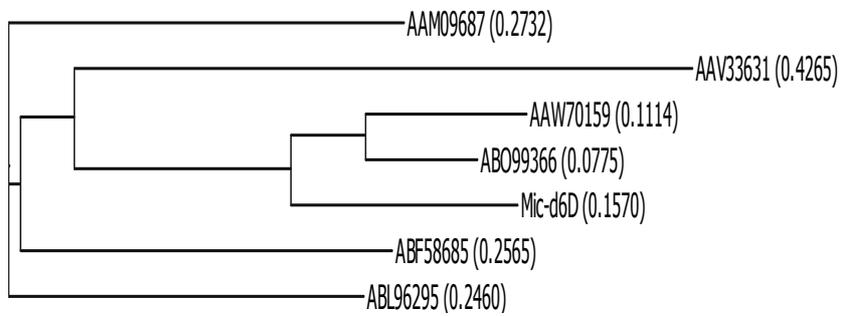
**Figura 3**



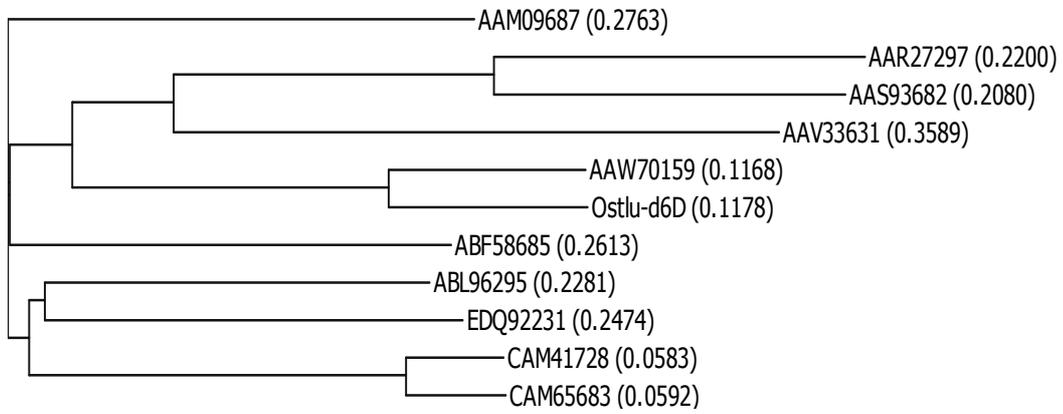
**Figura 4**



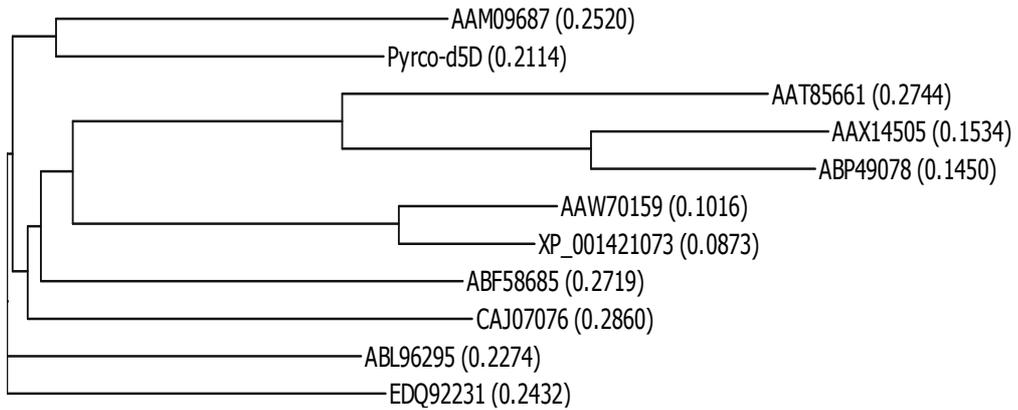
**Figura 5**



**Figura 6**



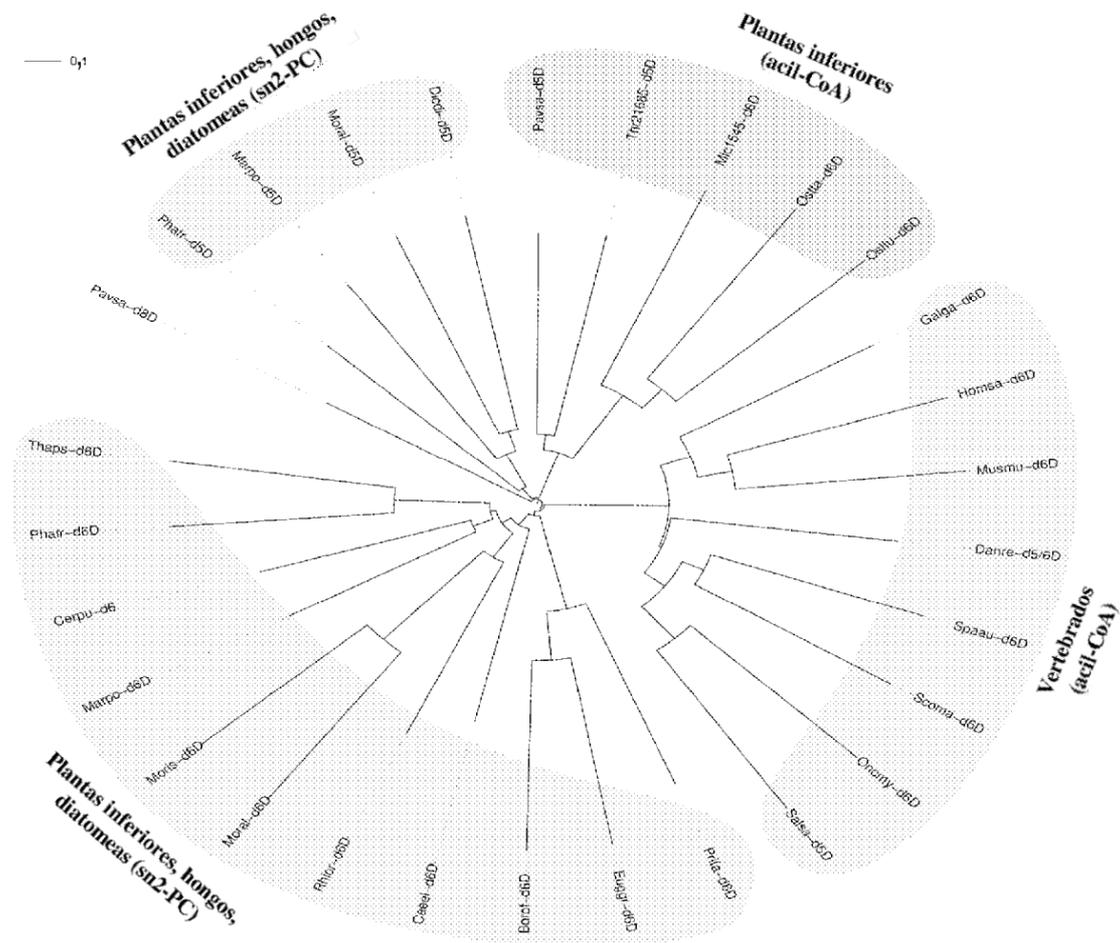
**Figura 7**



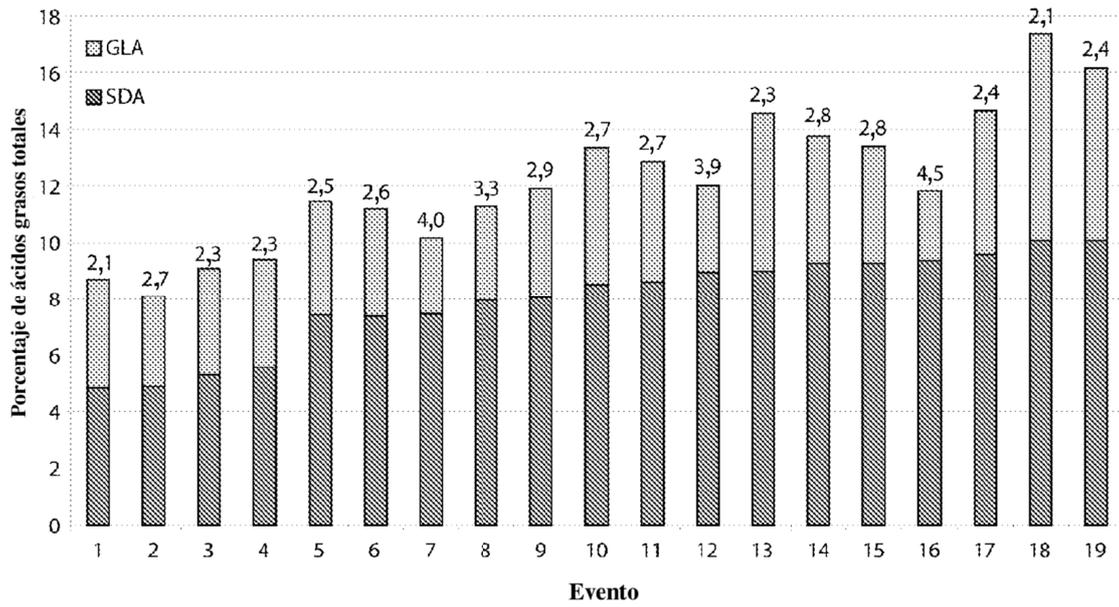
**Figura 8**

**M** (1) MCPPKTDG-----RSSPRSPLTRSKSSAEALDAKDASTAPVDLKTLEPHELAATFETRWRVED  
**OL** (1) MCVETTEGTSRTMANERTSSSSSLSEGGTPTVTVMGSEDAKTRNASVTAWTKELEPHALIAKTFERRRYVTIEG  
**OT** (1) MCVETEN-----N-DGIPITVEIAFDGE--RERAEANVKLSAEKMEPAALAKTFARRRYVVIEG  
 76  
**M** (60) VEYDVTFKHPGGSVIFYMLANTGADATEAFKFMRSLKAWKMLRALPSRPAEIKRSE-SEDAPMLEDFARWRA  
**OL** (76) VEYDVTFKHPGGSVIYYMLSNTGADATEAFKFEHYRSKKARKALAAALPHKPVDAATREPIEDEAMLKDFAQWRK  
**OT** (55) VEYDVTFKHPGGTIVIFYALSNTGADATEAFKFEHRSRKARKALAAALPSRPAKTAK---VDDAEMLQDEFAKWRK  
 151  
**M** (134) ELERDGFKPSITHVAYRLLELLATFALGTALMYAGYPIIASVVYGAFFGARCWWQHEGCHNSLTGSVYVDKRI  
**OL** (151) ELEREGFFKPSAHVAYRFAELAAAMFALGTALMHARWHVASVIYSCFFGARCWWQHEGCHNSLTGNIIWWDKRI  
**OT** (127) ELERDGFKPSAHVAYRFAELAAAMYALGTYLMYARYVSSVLYVYACFFGARCWWQHEGCHSSLTGNIIWWDKRI  
 226  
**M** (209) QAMTCGFLSTSGEMNNQMHNKHHATPQKVRHMDLDTTPAVAFNTAVEDNRPGRFSRAWARLQAWTFVPVTSG  
**OL** (226) QAFAGFGLASGSDMNNMHNKHHATPQKVRHMDLDTTPTVAFFNSAVEENRPRGFSKLLWLRQLQAWTFVPVTSG  
**OT** (202) QAFTAGFGLAGSGDMNNSMHNKHHATPQKVRHMDLDTTPAVAFNTAVEDNRPGRFSKYWLRLQAWTFIPVTSG  
 301  
**M** (284) LLVQAFWIYVHLHPRQVLRKKNYEEASWMLVSHVVRTAVIKLATGYSWPVAYWWFTFGNWIAYMYLFAHFSTSHTH  
**OL** (301) -MVLFFWMFVHLHPRNALRRKSFEEAAWMSAHVIRTAVIKAVTGYSWIASYGLFAATMNASGCYLLFAHFSTSHTH  
**OT** (277) -LVLLFWMFFLHPSKALGGKYEELVWMLAAHVIRTWTIKAVTGFAMQSYGLFLATSWVSGCYLLFAHFSTSHTH  
 376  
**M** (359) LPVVP SDKHLSWVNYAVDHTVIDIDPSRGYVNWLMGYLNCQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRRFVPPFAKKWGLNYKVL  
**OL** (375) LDVVP SDKHLSWVRVAVDHTIDINPNSVNVNLMGYLNCQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRRFVPPFAKKWNLNYKVL  
**OT** (351) LDVVP ADEHL SWVRVAVDHTIDIDPSQGWVNVNLMGYLNCQVIHHLFPMPQFRQPEVSRRRFVAFACKWNLNYKVM  
 451  
**M** (434) SYYGAWKATFSNLDKVGQHYVNGKAEKAH---  
**OL** (450) TTYGAWKATFGNLNDVGKHYVYVHGSRVKSUSA  
**OT** (426) TYAGAWKATLGNLDNVGKHYVYVHGSHGKTA---

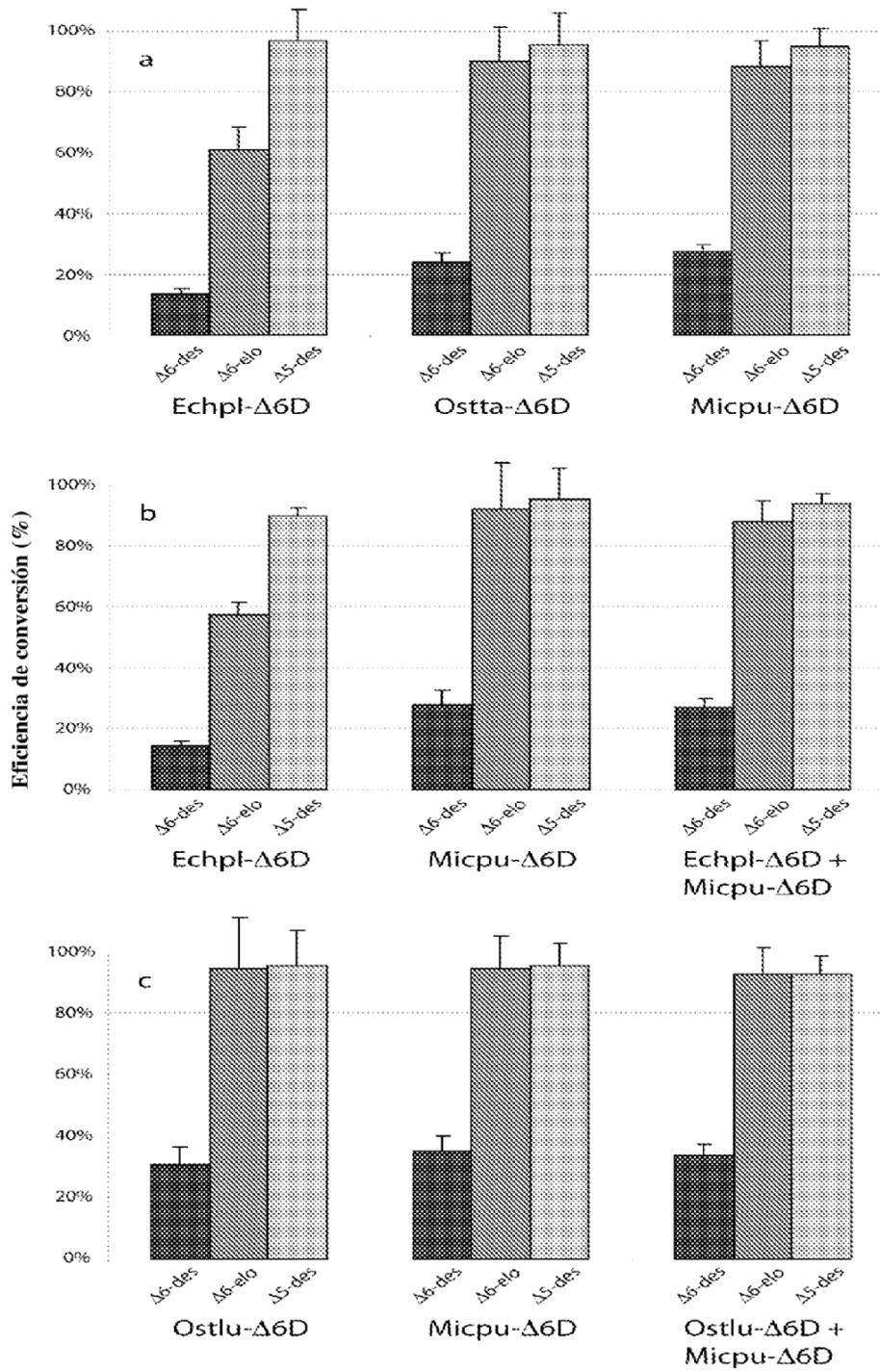
**Figura 9**



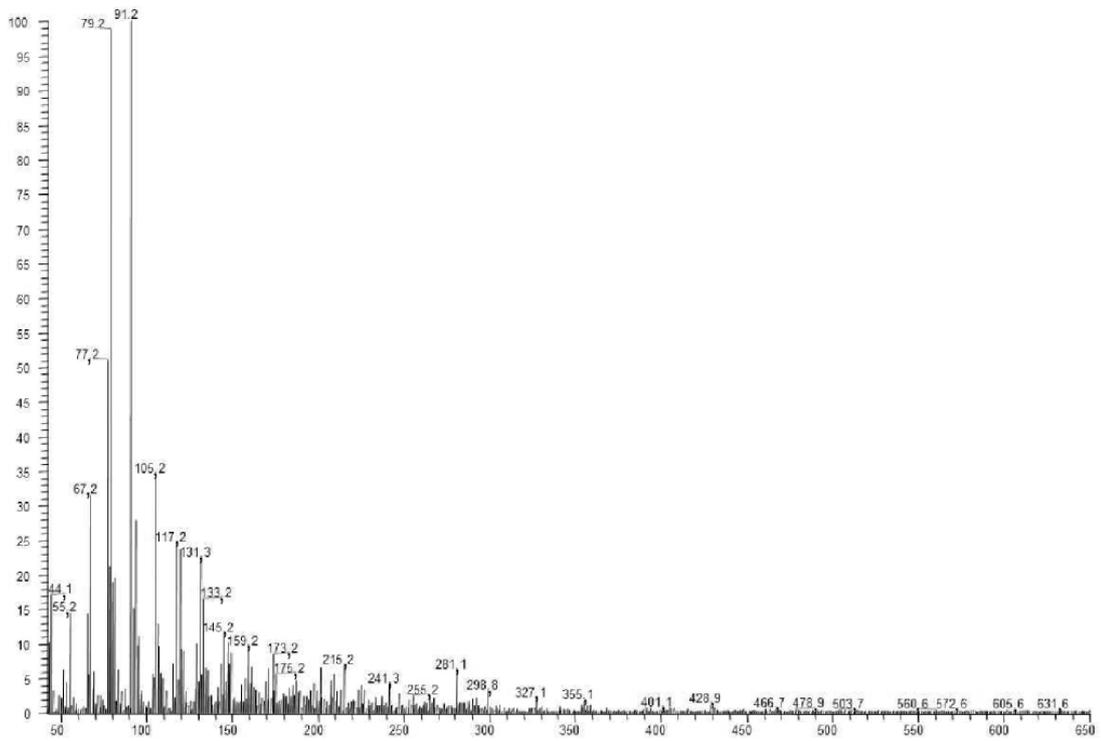
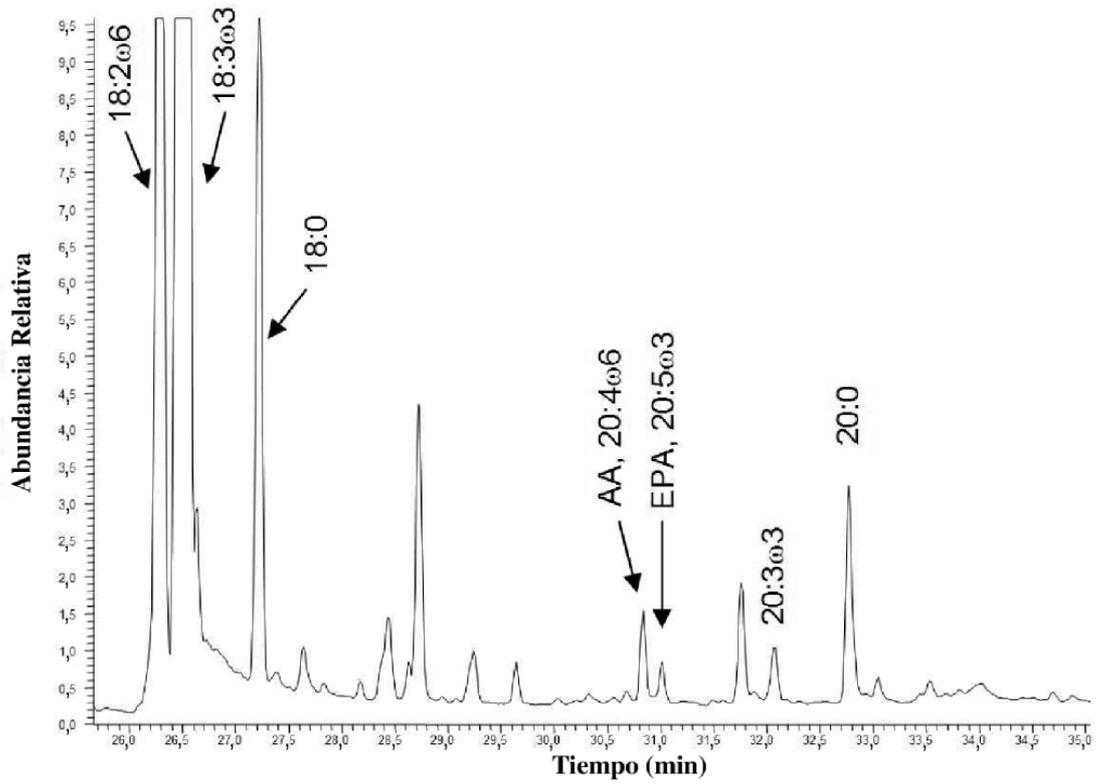
**Figura 10**



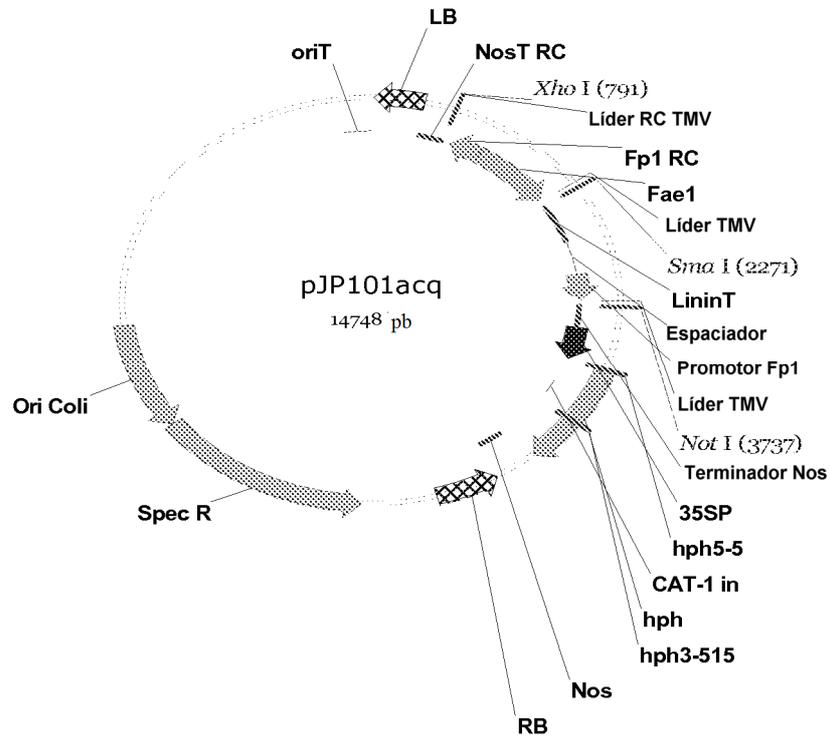
**Figura 11**



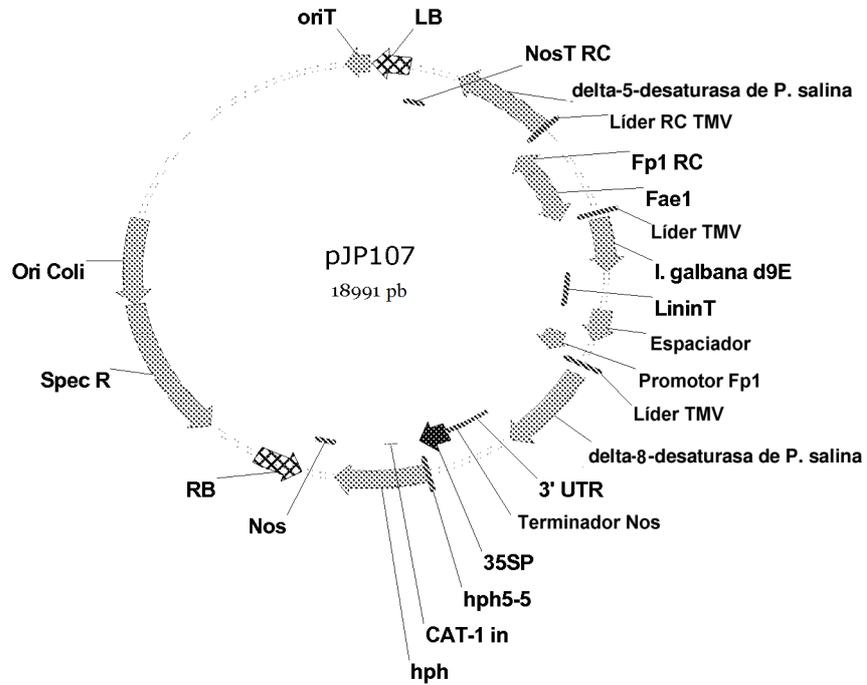
**Figura 12**



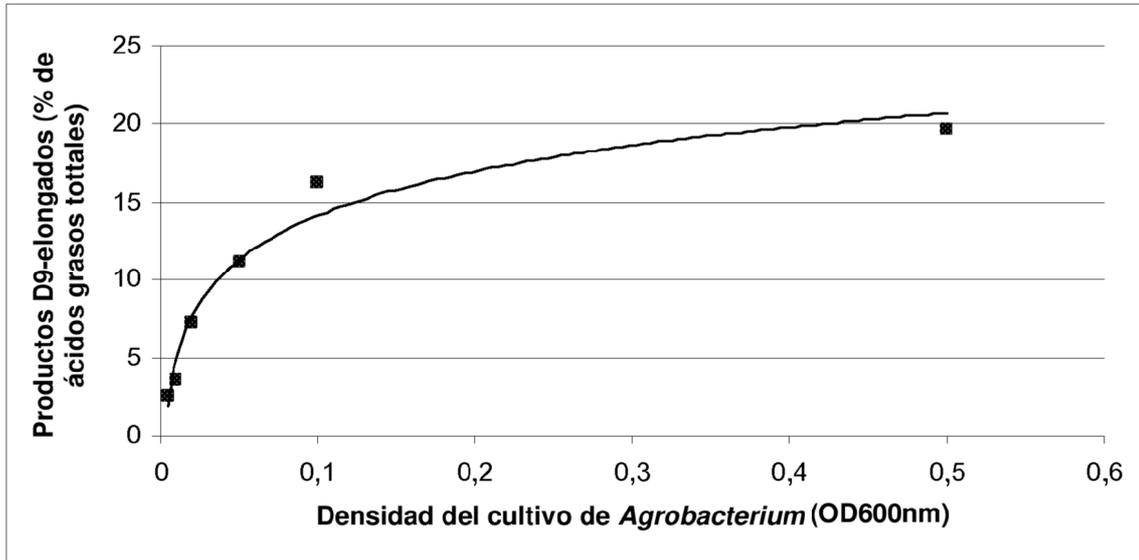
**Figura 13**



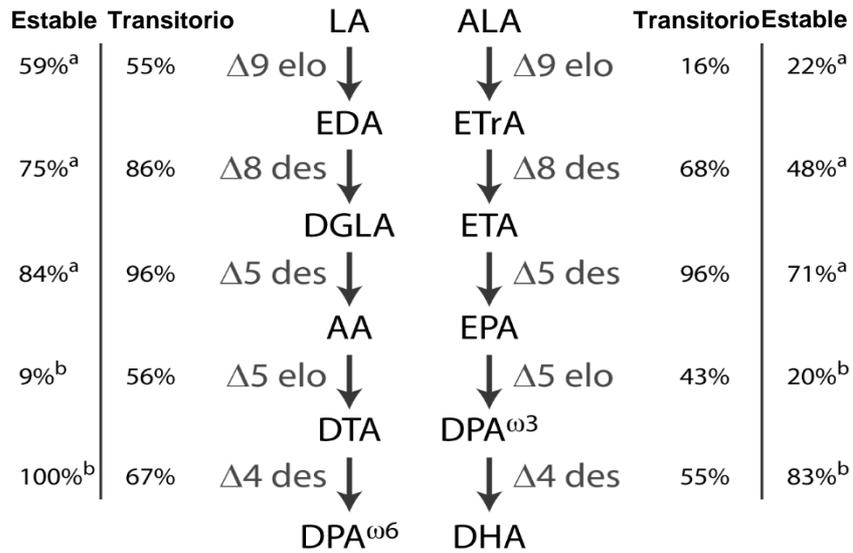
**Figura 14**



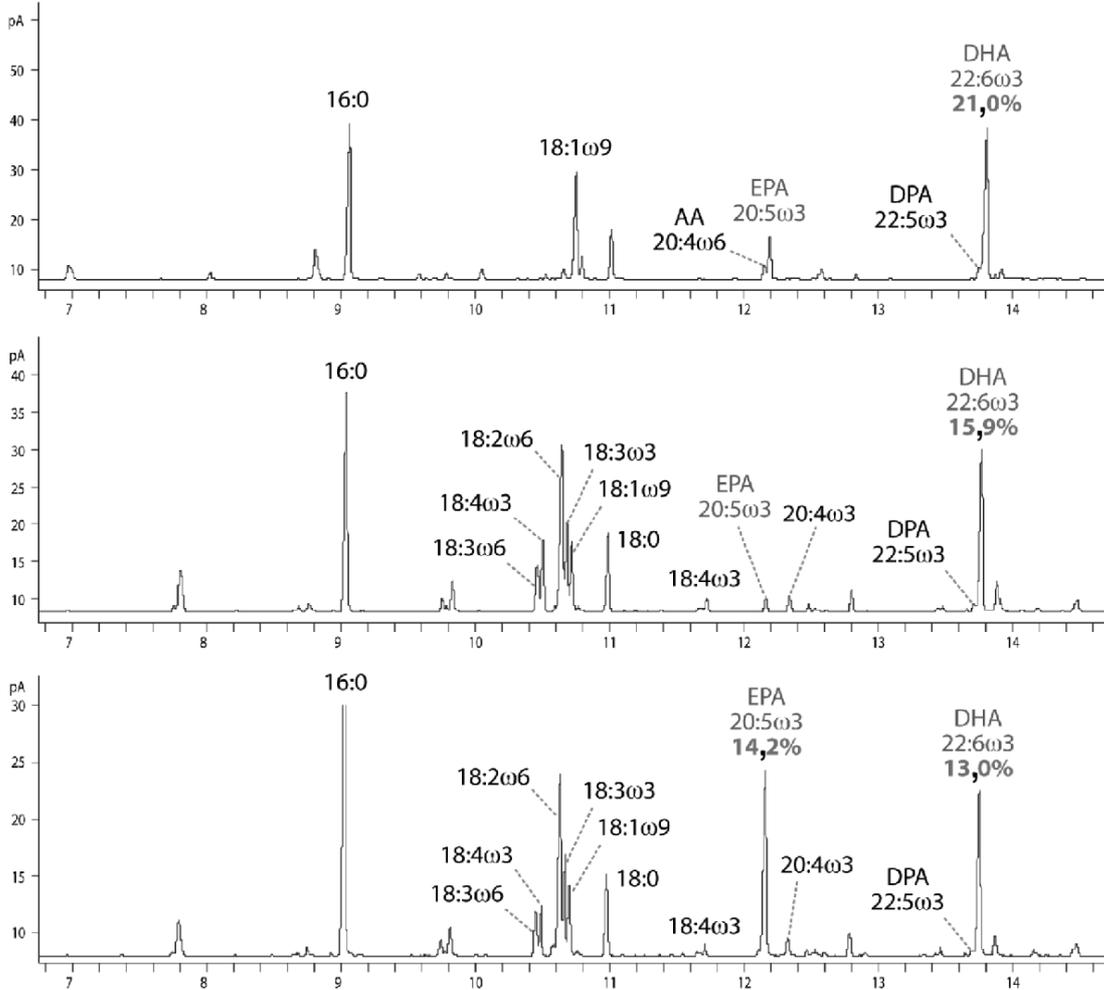
**Figura 15**



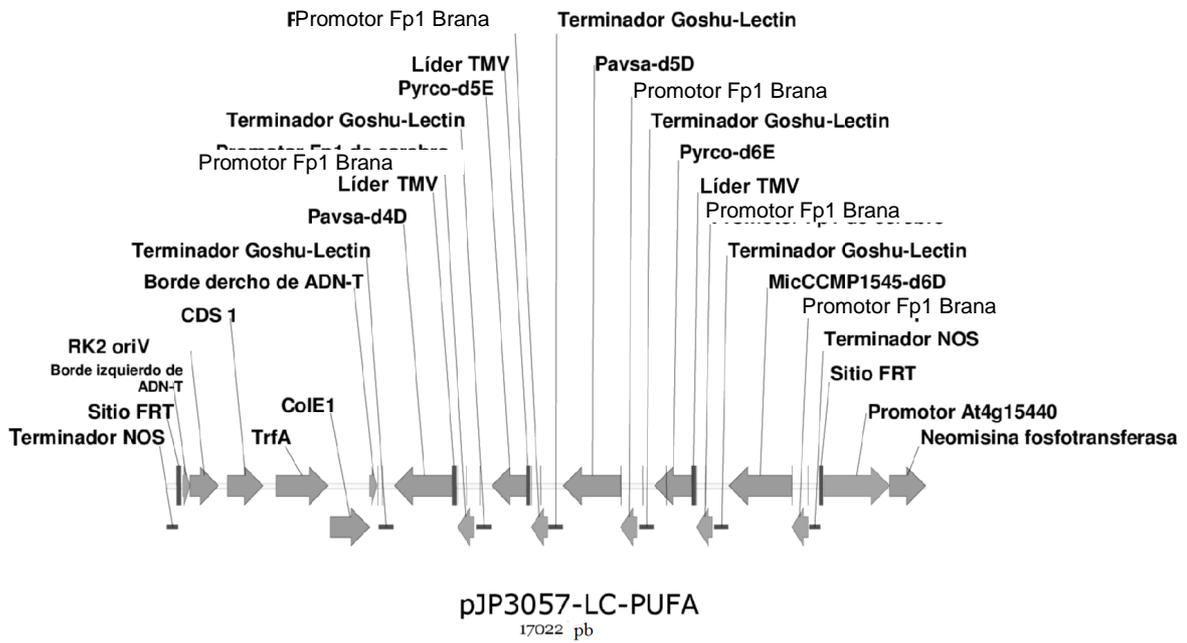
**Figura 16**



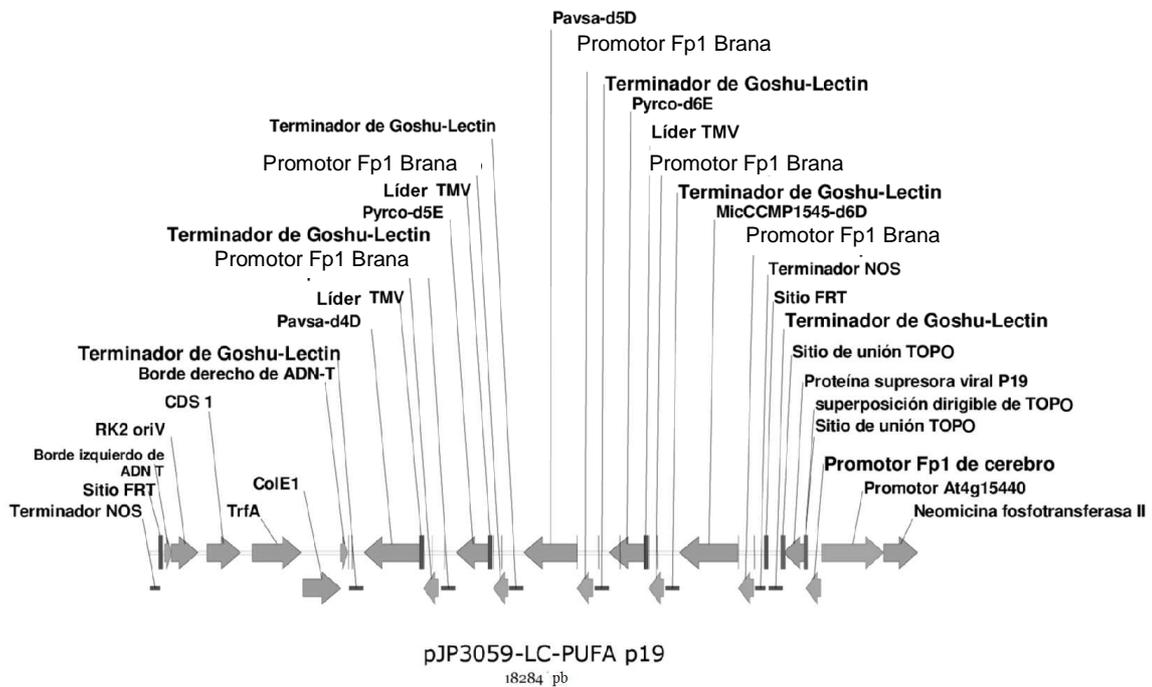
**Figura 17**



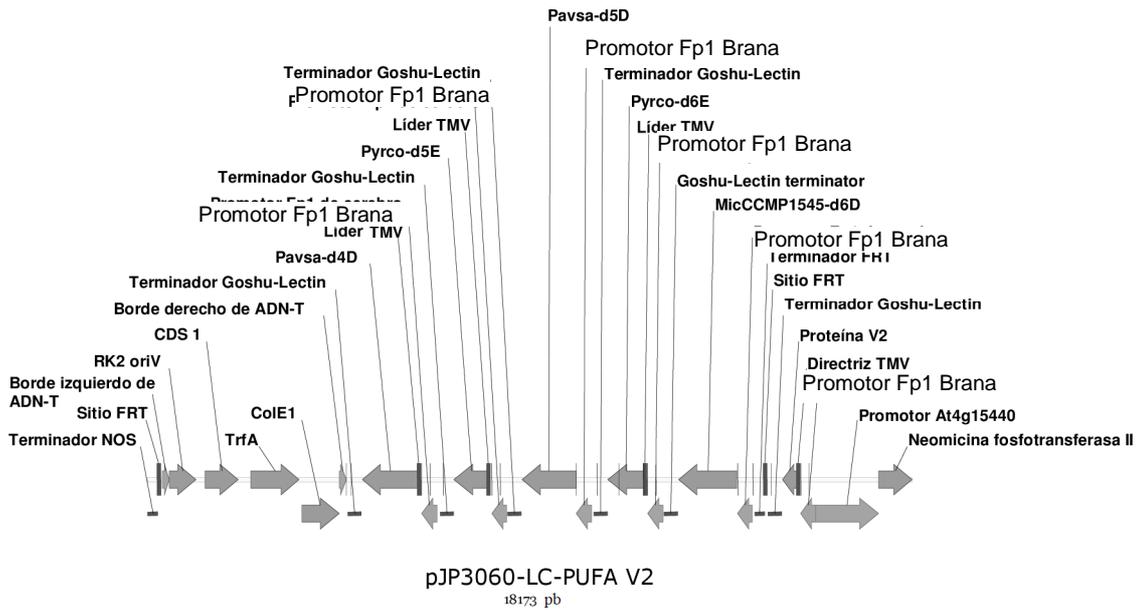
**Figura 18**



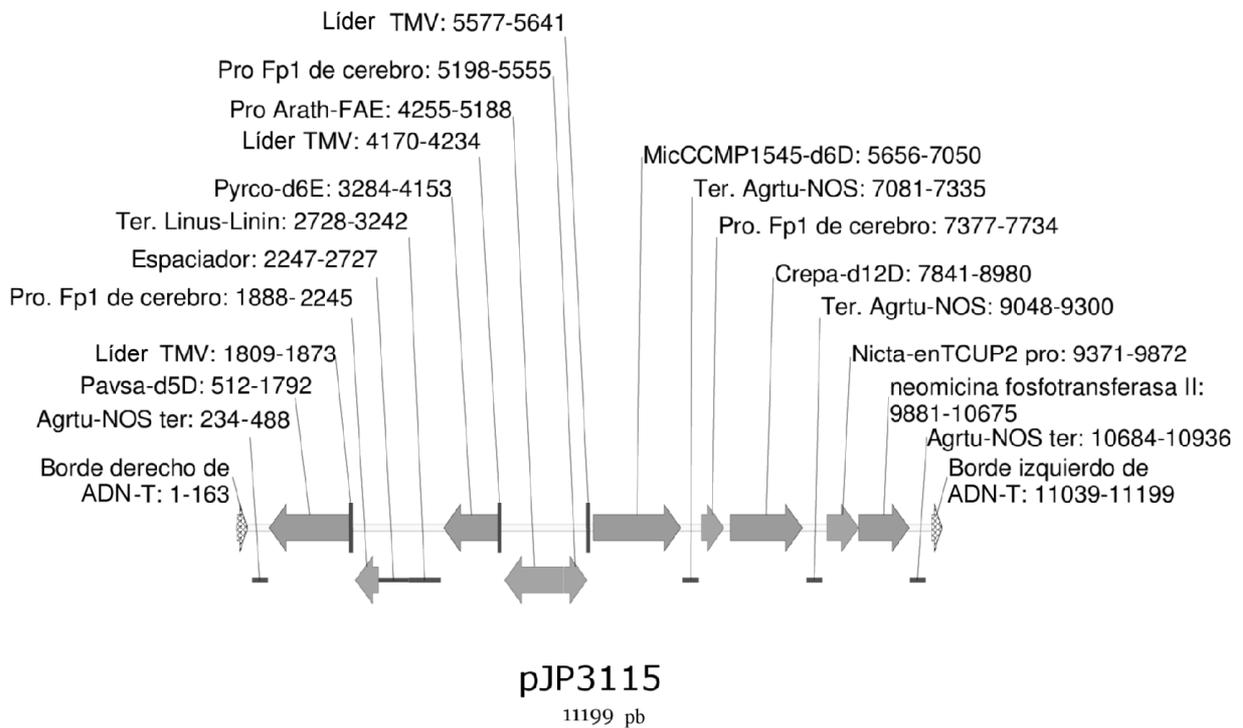
**Figura 19**



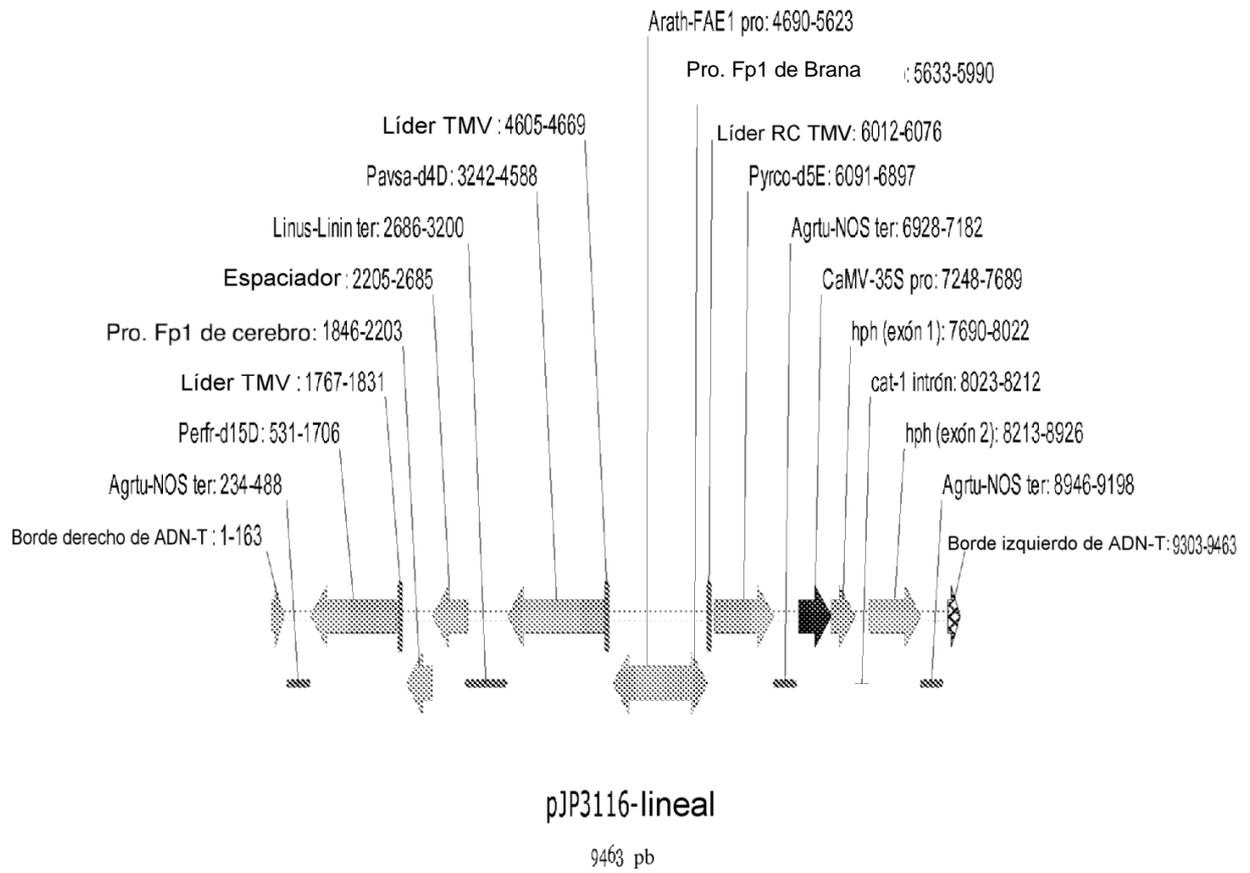
**Figura 20**



**Figura 21**



**Figura 22**



**Figura 23**