

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 640**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C11B 1/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2005 E 11155282 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2357243**

54 Título: **Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por células recombinantes**

30 Prioridad:

22.04.2004 US 564627 P
27.09.2004 US 613861 P
05.04.2005 AU 2005901673
05.04.2005 US 668705 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2019

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)**
Black Mountain Science and Innovation Park,
Clunies Ross Street
Acton, ACT 2601, AU

72 Inventor/es:

SINGH, SURINDER PAL;
ROBERT, STANLEY SURESH;
NICHOLS, PETER DAVID;
BLACKBURN, SUSAN IRENE ELLIS;
ZHOU, XUE-RONG;
PETRIE, JAMES ROBERTSON y
GREEN, ALLAN GRAHAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 715 640 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

Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por células recombinantes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para sintetizar ácidos poliinsaturados de cadena larga, especialmente ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, en células de planta recombinantes. También se proporcionan células de planta o plantas recombinantes que producen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Además, la presente invención se refiere a un grupo de nuevas enzimas que posee actividad desaturasa o elongasa que puede usarse en métodos de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Antecedentes de la invención

15 El o los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) omega-3 son hoy ampliamente conocidos como compuestos importantes para la salud humana y animal. Estos ácidos grasos pueden obtenerse de fuentes de la dieta o por conversión de ácidos grasos linoleico (LA, omega-6) o α -linolénico (ALA, omega-3), considerándose ambos como ácidos grasos esenciales en la dieta humana. Aunque los seres humanos y muchos otros animales vertebrados son capaces de convertir LA o ALA, obtenidos de fuentes de planta, en LC-PUFA, llevan a cabo esta conversión a una velocidad muy baja. Además, las sociedades más modernas tienen dietas desequilibradas en las que al menos 90 % de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) consisten en ácidos grasos omega-6, en lugar de la proporción 4:1 o menor para ácidos grasos omega-6:omega-3 que se considera ideal (Trautwein, 2001). La fuente de la dieta inmediata de LC-PUFA tal como ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6) para los seres humanos es mayoritariamente de pescado o aceite de pescado. Los profesionales sanitarios han recomendado por lo tanto la inclusión regular de pescado que contiene niveles significativos de LC-PUFA en la dieta humana. De forma creciente, los aceites LC-PUFA derivados de pescado se están incorporando en productos alimenticios y en fórmulas infantiles. Sin embargo, debido a una disminución en los sectores pesqueros globales y nacionales, se necesitan fuentes alternativas de estos aceites beneficiosos que potencian la salud.

30 La inclusión de LC-PUFA omega-3 tal como EPA y DHA en la dieta humana se ha ligado a numerosos beneficios relacionados con la salud. Éstos incluyen la prevención o reducción de enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, diabetes de tipo 2, enfermedad renal, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y la ayuda en el desarrollo cerebral y el crecimiento (Simopoulos, 2000). Más recientemente, varios estudios también han indicado que PUFA omega-3 puede ser beneficioso en la nutrición y desarrollo infantil y frente a varios trastornos mentales tales como esquizofrenia, trastorno hiperactivo con déficit de atención y enfermedad de Alzheimer.

Las plantas superiores, a diferencia de los animales, carecen de la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados con longitudes de cadena mayores de 18 carbonos. En particular, las plantas cultivadas y hortícolas junto con otras angiospermas no tienen las enzimas necesarias para sintetizar los ácidos grasos omega-3 con cadenas más largas tales como EPA, DPA y DHA que derivan de ALA. Un objetivo importante en la biotecnología de plantas es por lo tanto la preparación por ingeniería de plantas cultivadas, particularmente cultivos oleaginosos, que producen cantidades sustanciales de LC-PUFA, proporcionando así una fuente alternativa de estos compuestos.

45 *Rutas de síntesis de LC-PUFA*

La biosíntesis de LC-PUFA a partir de ácidos grasos linoleico y α -linolénico en organismos tales como microalgas, musgos y hongos puede ocurrir por una serie de desaturaciones y reacciones de elongación alternantes dependientes de oxígeno como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. En una ruta (Figura 1, II), las reacciones de desaturación están catalizadas por $\Delta 6$, $\Delta 5$, y $\Delta 4$ desaturasas, cada una de las cuales añade un enlace doble adicional a la cadena de carbono del ácido graso, mientras cada una de las reacciones de $\Delta 6$ y $\Delta 5$ elongasa añade una unidad de dos carbonos para aumentar la longitud de la cadena. La conversión de ALA a DHA en estos organismos requiere por lo tanto tres desaturaciones y dos elongaciones. Los genes que codifican las enzimas requeridas para la producción de DHA en esta ruta aeróbica se han clonado de varios microorganismos y plantas inferiores incluyendo microalgas, musgos, hongos. Los genes que codifican algunas de las enzimas incluyendo una que cataliza la quinta etapa, la $\Delta 5$ elongasa, se han aislado de animales vertebrados incluyendo mamíferos (revisado en Sayanova y Napier, 2004). Sin embargo, la $\Delta 5$ elongasa aislada de células humanas no es específica para la reacción EPA a DPA, teniendo una especificidad amplia para los sustratos ácido graso (Leonard et al., 2002).

60 Se ha mostrado que existen rutas alternativas para dos secciones de la ruta ALA a DHA en algunos grupos de organismos. La conversión de ALA a EPA puede llevarse a cabo por una combinación de una $\Delta 9$ elongasa y una $\Delta 8$ desaturasa (la denominada ruta $\Delta 8$ desaturación, véase la Figura 1, IV) en determinados protistas y traustocitridos, como se pone de manifiesto por los genes aislados que codifican dichas enzimas (Wallis y Browse, 1999; Qi et al., 2002). En mamíferos, la ruta denominada "Sprecher" convierte DPA en DHA por tres reacciones, independiente de una $\Delta 4$ desaturasa (Sprecher et al., 1995).

Además de estos sistemas desaturasa/elongasa, EPA y DHA también pueden sintetizarse mediante una ruta anaeróbica en varios organismos tales como *Shewanella*, *Mortierella* y *Schizochytrium* (Abadi et al., 2001). Los operones que codifican estos complejos de enzima poli-catenario sintasa (PKS) se han clonado de algunas bacterias (Morita et al., 2000; Metz et al., 2001; Tanaka et al., 1999; Yazawa, 1996; Yu et al., 2000; WO 00/42195). El operón EPA PKS aislado de *Shewanella spp* se ha expresado en *Synechococcus* permitiéndole sintetizar EPA (Takeyama et al., 1997). Los genes que codifican estas enzimas se organizan en operones relativamente grandes, y no se ha informado de su expresión en plantas transgénicas. Por lo tanto, está por ver si el sistema anaeróbico semejante a PKS es una alternativa posible a la desaturasa/elongasa aeróbica más clásica para la síntesis transgénica de LC-PUFA.

Desaturasas

Las enzimas desaturasas que se ha mostrado que participan en la biosíntesis de LC-PUFA pertenecen todas al grupo denominado desaturasas "front-end" ("extremo-frontal") que se caracterizan por la presencia de un dominio citocromo b_5 en el extremo N de cada proteína. El dominio $cyt\ b_5$ actúa presumiblemente como un receptor de electrones requerido para la desaturación (Napier et al., 1999; Sperling y Heinz, 2001).

La enzima $\Delta 5$ desaturasa cataliza la desaturación adicional de C20 LC-PUFA dando lugar a ácido araquidónico (ARA, 20:4 ω 6) y EPA (20:5 ω 3). Los genes que codifican esta enzima se han aislado de varios organismos, incluyendo algas (*Thraustochytrium* sp. Qiu et al., 2001), hongos (*M. alpine*, *Pythium irregulare*, Michaelson et al., 1998; Hong et al., 2002), *Caenorhabditis elegans* y mamíferos. Un gen que codifica una $\Delta 5$ -/ $\Delta 6$ - desaturasa bifuncional también se ha identificado en el pez cebra (Hasting et al., 2001). El gen que codifica esta enzima podría representar una forma ancestral de la "desaturasa de extremo frontal" ("front-end") que posteriormente se duplicó y desarrolló distintas funciones. La última etapa de desaturación para producir DHA está catalizada por una $\Delta 4$ desaturasa y se ha aislado un gen que codifica esta enzima de la especie de protista de agua dulce *Euglena gracilis* y la especie marina *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003).

Elongasas

También se han aislado varios genes que codifican enzimas de elongación de PUFA (Sayanova y Napier, 2004). Los miembros de esta familia de genes no estaban relacionados con los genes de elongasa presentes en plantas superiores, tales como FAE1 de *Arabidopsis*, que están implicados en la extensión de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Un ejemplo del último es ácido erúico (22:1) en *Brassicas*. En algunas especies de protistas, LC-PUFA se sintetizan por elongación de ácido linoleico o ácido α -linolénico con una unidad C2, antes de la desaturación con $\Delta 8$ desaturasa (Figura 1 parte IV; ruta "desaturación $\Delta 8$ "). Las actividades $\Delta 6$ desaturasa y $\Delta 6$ elongasa no se detectaron en estas especies. En lugar de esto, se esperaría una actividad A9-elongasa en dichos organismos, y apoyando esto, se ha aislado recientemente un gen C18 $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana* (Qi et al., 2002).

Producción por ingeniería de LC-PUFA

Los cultivos oleaginosos transgénicos que se prepararon por ingeniería para producir LC-PUFA principal por inserción de estos genes se han sugerido como una fuente sostenible de ácidos grasos nutricionalmente importantes. Sin embargo, el requerimiento para la expresión y actividad coordinada de cinco enzimas nuevas codificadas por genes de fuentes posiblemente diversas ha hecho que este objetivo sea difícil de conseguir y la proposición permanece hasta ahora como una especulación.

La ruta biosintética dependiente de oxígeno de LC-PUFA para formar EPA (Figura 1) se ha constituido con éxito en levaduras por la co-expresión de una $\Delta 6$ -elongasa con $\Delta 6$ y $\Delta 5$ ácido graso desaturasas, lo que resulta en una acumulación pequeña pero significativa de ARA y EPA a partir de ácidos linoleico y α -linolénico suministrados exógenamente (Beaudoin et al., 2000; Zank et al., 2000). Esto demostró la capacidad de los genes que pertenecen a la ruta de síntesis de LC-PUFA de funcionar en organismos heterólogos. Sin embargo, la eficiencia para producir EPA fue muy baja. Por ejemplo, tres genes obtenidos de *C. elegans*, *Borago officinalis* y *Mortierella alpina* se expresaron en levadura (Beaudoin et al., 2000). Cuando se suministró a las levaduras transformadas 18:2 ω -3 (LA) o 18:3 ω -3 (ALA), hubo una ligera producción de 20:4 ω -6 o 20:5 ω -3, con eficiencias de conversión de 0,65 % y 0,3 %, respectivamente. Otros trabajadores obtuvieron de manera similar una eficiencia muy baja en la producción de EPA usando genes que expresan dos desaturasas y una elongasa en levaduras (Domergue et al., 2003a; Zank et al., 2002). Por lo tanto, todavía existe una necesidad de mejorar la eficiencia en la producción de EPA en organismos tales como levaduras, por no hablar de la producción del C22 PUFA que requiere el suministro de etapas enzimáticas adicionales.

Se ha hecho algún progreso en la misión de introducir la ruta biosintética aeróbica de LC-PUFA en plantas superiores incluyendo cultivos oleaginosos (revisado por Sayanova y Napier, 2004; Drexler et al., 2003; Abadi et al., 2001). Se expresó un gen que codifica una $\Delta 6$ -ácido graso desaturasa aislado de borraja (*Borago officinalis*) en tabaco transgénico y *Arabidopsis*, lo que resultó en la producción de GLA (18:3 ω 6) y SDA (18:4 ω 3), los precursores

directos de LC-PUFA, en las plantas transgénicas (Sayanova et al., 1997; 1999). Sin embargo, esto solo proporciona una primera etapa única.

Domergue et al. (2003a) usaron una combinación de tres genes, que codifican $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ ácido graso desaturasa y una $\Delta 6$ -elongasa tanto en levadura como en linaza transgénico. Los genes desaturasa se obtuvieron de la diatomea *Phaeodactylum tricomutum* y el gen de elongasa del musgo *Physcomitrella patens*. Se obtuvieron rendimientos bajos de elongación para ácidos grasos $\Delta 6$ producidos endógenamente en células de levadura (es decir, combinando la primera y segunda etapa enzimática), y el producto principal C20 PUFA formado fue 20:2 $\Delta^{11,14}$, representando una reacción secundaria no deseada. Domergue et al. (2003a) también afirman, sin datos presentados, que la combinación de los tres genes se expresó en linaza transgénico con ARA y EPA producidos consecuentemente, pero esta producción fue ineficiente. Comentaron que el mismo problema que el que se había observado en levadura existió en las semillas de plantas superiores y que es necesario sortear el "cuello de botella" para la producción de LC-PUFA en cultivos oleaginosos.

WO 2004/071467 (DuPont) informó de la expresión de varias desaturasa y elongasa en células de soja pero no mostró la síntesis de DHA en plantas regeneradas o en semillas.

Abbadí et al. (2004) describieron intentos para expresar combinaciones de desaturasa y elongasa en linaza transgénico, pero solo se consiguieron niveles bajos de EPA. Abbadí et al. (2004) indicaron que sus niveles bajos de producción de EPA también se debieron a un "cuello de botella" desconocido.

Qi et al. (2004) consiguieron síntesis en hojas pero no informaron sobre resultados en semillas. Éste es un asunto importante ya que la naturaleza de la síntesis de LC-PUFA puede variar entre hojas y semillas. En particular, las semillas oleaginosas almacenan lípido en semillas en su mayor parte como TAG mientras las hojas sintetizan el lípido en su mayor parte como fosfatidil lípidos. Además, Qi et al. (2004) solo produjeron AA y EPA.

Como resultado, existe una necesidad de métodos adicionales para producir poliinsaturados de cadena larga, particularmente EPA, DPA y DHA, en células recombinantes.

30 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una célula vegetal recombinante que sintetiza ácido docosapentaenoico (DPA) a partir de ácido α -linolénico (ALA), que comprende uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:

- una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, en el que el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en el que la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte EPA en DPA.

Al menos una de las enzimas es una $\Delta 5$ elongasa que también tiene actividad $\Delta 6$ elongasa.

Los presentes inventores son los primeros en identificar una enzima que tiene mayor actividad $\Delta 5$ elongasa que actividad $\Delta 6$ elongasa. Como resultado, esta enzima proporciona un medio eficiente para producir DPA en una célula recombinante ya que la $\Delta 5$ elongación de EPA se ve favorecida sobre la $\Delta 6$ elongación de SDA. Así, en una realización, la $\Delta 5$ elongasa es relativamente específica, esto es, la $\Delta 5$ elongasa también tiene actividad $\Delta 6$ elongasa y la elongasa es más eficiente sintetizando DPA a partir de EPA de lo que es sintetizando ETA a partir de SDA.

En otra realización, la $\Delta 5$ elongasa comprende

- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2,
- ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, idéntica a SEQ ID NO:2, o
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

En otra realización, la $\Delta 5$ elongasa puede purificarse de algas.

Como se describe en el presente documento, al menos una de las enzimas puede ser una $\Delta 9$ elongasa.

Los presentes inventores son los primeros en identificar una enzima que tiene tanto actividad $\Delta 9$ elongasa como actividad $\Delta 6$ elongasa. Cuando se expresa en una célula con una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 8$ desaturasa esta enzima puede usar las dos rutas disponibles para producir ETA a partir de ALA, DGLA a partir de LA, o ambas (véase la Figura 1), incrementando así la eficiencia de la producción de ETA y/o DGLA. Así, la $\Delta 9$ elongasa también puede tener actividad $\Delta 6$ elongasa. Preferiblemente, la $\Delta 9$ elongasa es más eficiente para sintetizar ETrA a partir de ALA de lo que es para sintetizar ETA a partir de SDA. Además, en otra realización la $\Delta 9$ elongasa es capaz de elongar SDA a ETA, GLA a DGLA, o ambas, en una célula de levadura.

La $\Delta 9$ elongasa puede comprender

- 5
- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86,
 - ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, idéntica a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, o
 - iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

Preferiblemente, la $\Delta 9$ elongasa puede purificarse de algas u hongos.

10

Es muy conocido en la técnica que cuanto mayor es el número de transgenes en un organismo, mayor es la probabilidad de que esté comprometido al menos un parámetro de aptitud del organismo, tal como nivel de expresión de al menos uno de los transgenes, velocidad de crecimiento, producción de aceite, capacidad reproductora etc. De acuerdo con esto, es deseable minimizar el número de transgenes en una célula recombinante.

15

Para este fin, los presentes inventores han considerado numerosas estrategias para producir LC-PUFA en una célula lo que evitará la necesidad de un gen para cada etapa en la ruta relevante.

Así, en otra realización, al menos una de las enzimas es una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional o una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional. De acuerdo con la invención, al menos una de las enzimas es una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional. La $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional puede producirse naturalmente por una especie de pez de agua dulce.

20

En una realización particular, la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional comprende

- 25
- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:15,
 - ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, idéntica a SEQ ID NO: 15, o
 - iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

Preferiblemente, la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional se produce naturalmente por una especie de pez de agua dulce.

30

Preferiblemente, la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional comprende

- 35
- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 14,
 - ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, idéntica a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 14, o
 - iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

De acuerdo con la invención, al menos una de las enzimas es una $\Delta 5$ desaturasa.

40

Como se describe en el presente documento, al menos una de las enzimas puede ser una $\Delta 8$ desaturasa.

En otra realización, la célula vegetal es capaz de sintetizar ácido docosahexaenoico (DHA).

Preferiblemente, las enzimas son una cualquiera de las combinaciones siguientes;

45

- i) una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional, una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, y una $\Delta 4$ desaturasa, o
- ii) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, y una $\Delta 4$ desaturasa.

Como se describe en el presente documento, LC-PUFA es DHA y el o los polinucleótidos introducidos codifican cinco enzimas en el que las enzimas son una cualquiera de las combinaciones siguientes;

50

- i) una $\Delta 4$ desaturasa, una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, una $\Delta 5$ elongasa y una $\Delta 6$ elongasa, o
- ii) una $\Delta 4$ desaturasa, una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 8$ desaturasa, una $\Delta 5$ elongasa y una $\Delta 9$ elongasa.

De acuerdo con la invención, la célula vegetal es capaz de sintetizar ácido docosapentaenoico (DPA).

55

Las enzimas son de la combinación siguiente;

- 60
- i) una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional,
 - ii) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional.

Como se describe en el siguiente documento, LC-PUFA es DPA y el o los polinucleótidos introducidos codifican cuatro enzimas en el que las enzimas son una cualquiera de las combinaciones siguientes;

- 65
- i) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, una $\Delta 5$ elongasa y una $\Delta 6$ elongasa, o
 - ii) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 8$ desaturasa, una $\Delta 5$ elongasa y una $\Delta 9$ elongasa.

En una realización adicional, la planta es capaz de sintetizar ácido eicosapentaenoico (EPA).

5 Preferiblemente, el o los polinucleótidos introducidos codifican una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional.

Como se describe en el presente documento el o los polinucleótidos introducidos codifican tres enzimas en el que las enzimas son una cualquiera de las siguientes combinaciones;

- 10 i) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, y una $\Delta 6$ elongasa, o
ii) una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 8$ desaturasa, y una $\Delta 9$ elongasa.

15 Hasta la fecha la evidencia sugiere que las desaturasas expresadas en al menos algunas células recombinantes, particularmente levadura, tienen una actividad relativamente baja. Sin embargo, los presentes inventores han identificado que esto puede ser función de la capacidad de la desaturasa para usar acil-CoA como un sustrato en la síntesis de LC-PUFA. A este respecto, también se ha determinado que la desaturasa de origen vertebrado son particularmente útiles para la producción de LC-PUFA en células recombinantes, por ejemplo, células de planta, semillas o levaduras. Así, en otra realización preferida, la célula recombinante comprende cualquiera de

- 20 i) al menos una $\Delta 5$ elongasa cataliza la conversión de EPA en DPA en la célula,
ii) al menos una desaturasa que es capaz de actuar en un sustrato acil-CoA,
iii) al menos una desaturasa de un vertebrado o una desaturasa variante de ésta, o
iv) cualquier combinación de i) ii) o iii).

25 En una realización particular, la $\Delta 5$ elongasa comprende

- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2,
ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:2, o
30 iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

La desaturasa capaz de actuar en un sustrato acil-CoA o de un vertebrado puede ser una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa, o ambas. En una realización particular, la desaturasa comprende

- 35 i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:22,
ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:21 o SEQ ID NO:22, o
iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

40 Preferiblemente, la al menos una desaturasa se produce naturalmente por un vertebrado.

Aunque la célula vegetal puede ser cualquier tipo celular, preferiblemente, dicha célula es capaz de producir dicho LC-PUFA a partir de ácido linoleico (LA), ácido α -linolénico (ALA) producidos endógenamente, o ambos. Más preferiblemente, la proporción de ALA a LA producidos endógenamente es al menos 1:1 o al menos 2:1.

45 En una realización, la célula es una célula vegetal de una angiosperma, una célula vegetal oleaginosa, o una célula en una semilla. Preferiblemente, al menos un promotor es un promotor específico de semilla.

50 En una realización más, la célula vegetal recombinante produce un LC-PUFA que se incorpora en triacilgliceroles en dicha célula. Más preferiblemente, al menos 50 % del LC-PUFA que se produce en dicha célula se incorpora en triacilgliceroles.

En otra realización, al menos la región codificadora de proteína de uno, dos o más de los polinucleótidos se obtiene de un gen de alga. Preferiblemente, el gen de alga es del género *Pavlova* tal como de la especie *Pavlova salina*.

55 En otro aspecto, la célula recombinante de la invención es capaz de producir DHA a partir de un ácido graso que es ALA, LA, GLA, ARA, SDA, ETA, EPA, o cualquier combinación o mezcla de éstos, en el que dicha célula recombinante se obtiene de una célula que no es capaz de sintetizar DHA.

60 En un aspecto más, la célula recombinante de la invención es capaz de producir DPA a partir de un ácido graso que es ALA, LA, GLA, ARA, SDA, ETA, EPA, o cualquier combinación o mezcla de éstos, en el que dicha célula recombinante se obtiene de una célula que no es capaz de sintetizar DPA.

65 En un aspecto adicional más, la célula recombinante de la invención es capaz de producir EPA a partir de un ácido graso que es ALA, LA, GLA, ARA, SDA, ETA, o cualquier combinación o mezcla de éstos, en el que dicha célula recombinante se obtiene de una célula que no es capaz de sintetizar EPA.

En otro aspecto, la célula recombinante de la invención es capaz de producir tanto ETrA a partir de ALA como ETA a partir de SDA y que produce EPA a partir de un ácido graso que es ALA, LA, GLA, SDA, ETA, o cualquier combinación o mezcla de éstos, en el que dicha célula recombinante se obtiene de una célula que no es capaz de sintetizar ETrA, EPA o ambos.

5 En otro aspecto, la célula vegetal recombinante de la invención es capaz de producir DPA a partir de LA, ALA, EPA, o cualquier combinación o mezcla de éstos, en el que la célula vegetal es de una angiosperma.

En una realización, la célula vegetal también es capaz de producir DHA.

10 En otro aspecto más, la presente especificación describe una célula recombinante que es capaz de sintetizar DGLA, que comprende un o unos polinucleótidos que codifican uno o ambos de:

a) un polipéptido que es una $\Delta 9$ elongasa, en el que la $\Delta 9$ elongasa se selecciona del grupo que consiste en:

15 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86,

ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 40 % idéntica a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, y

20 iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii), y/o

b) un polipéptido que es una $\Delta 8$ desaturasa, en el que la $\Delta 8$ desaturasa se selecciona del grupo que consiste en:

i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:1,

25 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 40 % idéntica a SEQ ID NO:1, y

iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

30 en el que el o los polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dicho o dichos polinucleótidos en la célula, y en el que dicha célula recombinante deriva de una célula que no es capaz de sintetizar DGLA.

En una realización, la célula es capaz de convertir DGLA en ARA.

35 En otra realización, la célula comprende además un polinucleótido que codifica una $\Delta 5$ desaturasa, en el que el polinucleótido que codifica la $\Delta 5$ desaturasa está unido de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dicho polinucleótido en la célula, y en el que la célula es capaz de producir ARA.

40 En una realización particular, la célula carece de actividad $\omega 3$ desaturasa y no es capaz de producir ALA. Dichas células pueden ser naturales, o producirse reduciendo la actividad $\omega 3$ desaturasa de la célula usando técnicas muy conocidas en la técnica.

La célula es una célula vegetal.

45 En una realización más, una célula recombinante de la invención también posee la enzima requerida para realizar la ruta "Sprecher" de convertir EPA en DHA. Estas enzimas pueden ser nativas en la célula o producirse recombinantemente. Dichas enzimas incluyen al menos una $\Delta 7$ elongasa, $\Delta 6$ desaturasa y enzimas requeridas para la β -oxidación peroxisomal de ácido tetracosahexaenoico para producir DHA.

50 Los presentes inventores también han identificado un grupo de nuevas desaturasas y elongasas. Como resultado, aspectos adicionales de la especificación se refieren a estas enzimas, así como homólogos/variantes/derivados de éstas.

El polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende además al menos otra secuencia polipeptídica.

55 El al menos un otro polipéptido puede ser un polipéptido que aumenta la estabilidad de un polipéptido de la presente invención, o un polipéptido que asiste en la purificación de la proteína de fusión.

También se describen polinucleótidos aislados, que, entre otros, codifican polipéptidos de la invención.

60 En un aspecto más, la presente especificación describe un vector que comprende o codifica un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el polinucleótido está unido de manera operativa a un promotor específico de semilla.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula vegetal recombinante que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir una célula de la invención, comprendiendo el método introducir en una célula vegetal uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:

- 5 - una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional,

en el que el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en el que la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte EPA en DPA.

10 Naturalmente, se apreciará que cada una de las realizaciones descritas en la presente memoria en relación con las células de planta recombinantes de la invención se aplicará igualmente a métodos para la producción de dichas células.

15 En un aspecto más, la presente invención proporciona una célula producida por un método de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende al menos una célula recombinante según la invención.

20 Preferiblemente, la planta es una angiosperma. Más preferiblemente, la planta es una planta oleaginosa.

En una realización más, la planta transgénica, o parte de ésta incluyendo una semilla transgénica, no comprende un transgén que codifica una enzima que convierte preferentemente un $\omega 6$ LC-PUFA en un $\omega 3$ LC-PUFA.

25 En una realización adicional más, la planta transgénica, o parte de ésta incluyendo una semilla transgénica, comprende un transgén que codifica una $\Delta 8$ desaturasa y/o una $\Delta 9$ elongasa.

También se desvela aquí un método para producir una semilla oleaginosa, comprendiendo el método

- 30 i) crecer una planta oleaginosa transgénica según la invención en condiciones adecuadas, y
ii) recoger la semilla de la planta.

En un aspecto más, la especificación describe una parte de la planta transgénica de la invención, en el que dicha parte comprende un nivel incrementado de LC-PUFA en su ácido graso respecto a la parte correspondiente de una planta isogénica no transformada.

35 Preferiblemente, dicha parte de planta se selecciona de, pero no está limitado a, el grupo que consiste en: una semilla, hoja, tallo, flor, polen, raíces u órgano de almacenamiento especializado (tal como un tubérculo).

40 Anteriormente, no se ha mostrado que LC-PUFA pueda producirse en semillas de planta, ni que estos LC-PUFA puedan incorporarse en aceites de planta tal como triacilglicerol.

Así, en otro aspecto la presente invención proporciona una semilla transgénica que comprende un LC-PUFA en el que el LC-PUFA se selecciona del grupo que consiste en:

- 45 i) DPA,
ii) EPA y DPA, y
iii) EPA, DHA, y DPA.

50 Más preferiblemente, el LC-PUFA se selecciona del grupo que consiste en:

- i) DPA, o
ii) DHA y DPA.

55 Incluso más preferiblemente, el LC-PUFA es EPA, DHA, y DPA.

Preferiblemente, la semilla se obtiene de una semilla isogénica no transgénica que produce LA y/o ALA. Más preferiblemente, la semilla isogénica no transgénica comprende una mayor concentración de ALA que de LA en sus ácidos grasos. Incluso más preferiblemente, la semilla isogénica no transgénica comprende al menos

60 aproximadamente 13 % ALA o al menos aproximadamente 27 % ALA o al menos aproximadamente 50 % ALA en su ácido graso.

Preferiblemente, el ácido graso total en el aceite de la semilla comprende al menos 9 % ácidos grasos C20.

65 Preferiblemente, la semilla se obtiene de una planta oleaginosa. Más preferiblemente, la planta oleaginosa es canola (*Brassica napus*), maíz (*Zea mays*), girasol (*Helianthus annuus*), soja (*Glycine max*), sorgo (*Sorghum bicolor*), lino

(*Linum usitatissimum*), azúcar (*Saccharum officinarum*), remolacha (*Beta vulgaris*), algodón (*Gossypium hirsutum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), amapola (*Papaver somniferum*), mostaza (*Sinapis alba*), ricino (*Ricinus communis*), sésamo (*Sesamum indicum*), o alazor (*Carthamus tinctorius*).

5 Se prefiere que la semilla tenga una velocidad de germinación que es sustancialmente la misma que la de la semilla isogénica no transgénica.

Se prefiere además que el tiempo de germinación de la semilla sea sustancialmente el mismo que el de la semilla isogénica no transgénica.

10 Preferiblemente, al menos 25 %, o al menos 50 %, o al menos 75 % de los LC-PUFA en la semilla forman parte de triacilgliceroles.

15 Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las semillas transgénicas producidas usando los métodos de la invención tienen niveles de ALA y LA que son sustancialmente los mismos que los de una semilla isogénica no transgénica. Como resultado, se prefiere que la semilla transgénica tenga niveles de ALA y LA que son sustancialmente los mismos que los de una semilla isogénica no transgénica. Además, fue sorprendente encontrar que los niveles de ácidos grasos monoinsaturados estaban disminuidos en las semillas transgénicas producidas usando los métodos de la invención. De acuerdo con esto, en una realización más preferida, la semilla transgénica tiene niveles disminuidos de ácidos grasos monoinsaturados cuando se compara con una semilla isogénica no transgénica.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una semilla transgénica según la invención, comprendiendo el método

25 i) introducir en una célula progenitora de una semilla uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:

30 - una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, en el que el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, produciendo de esta manera una célula progenitora recombinante, en el que la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte EPA en DPA,

35 ii) cultivar dicha célula progenitora recombinante para producir una planta que comprende dicha semilla transgénica, y

iii) recuperar la semilla de la planta así producida.

40 En un aspecto adicional más, la presente especificación describe un método para producir una semilla transgénica que comprende cultivar una planta transgénica que produce la semilla transgénica de la invención, y recoger dicha semilla transgénica de la planta.

45 En un aspecto adicional, la especificación describe un extracto de la planta transgénica de la invención, o una parte de planta de la invención, o una semilla de la invención, en el que dicho extracto comprende un nivel incrementado de LC-PUFA en su ácido graso respecto a un extracto correspondiente de una planta isogénica no transformada.

Preferiblemente, el extracto es aceite sustancialmente purificado que comprende al menos 50 % triacilgliceroles.

50 También se proporciona un método para producir DPA, comprendiendo el método cultivar, en condiciones adecuadas, una célula recombinante según la invención.

En un aspecto, la célula es una célula de alga y el método comprende además crecer la célula de alga en condiciones adecuadas para la producción de dicho LC-PUFA.

55 En un aspecto más, la presente especificación describe un método para producir uno o más LC-PUFA, comprendiendo el método cultivar, en condiciones adecuadas, una planta transgénica de la invención.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir aceite que comprende DPA, que comprende obtener la planta transgénica de la invención, o la parte de planta de la invención, o la semilla de la invención, y extraer aceite de dicha planta o semilla.

Preferiblemente, dicho aceite se extrae de la semilla machacando dicha semilla.

65 En otro aspecto, la presente especificación describe un método para producir DPA a partir de EPA, comprendiendo el método exponer EPA a un polipéptido de la invención y un precursor de ácido graso, en condiciones adecuadas.

En un aspecto, el método se produce en una célula que usa el sistema de tipo poliquétido para producir EPA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una célula de la invención y un vehículo adecuado.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende la planta transgénica de la invención, o la semilla de la invención, y un vehículo adecuado.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un producto alimenticio que comprende una célula vegetal de la invención, una planta de la invención, la semilla de la invención, o una composición de la invención.

10 Preferiblemente, el producto alimenticio al menos comprende DPA, en el que al menos una reacción enzimática en la producción de DPA se realizó mediante una enzima recombinante en una célula.

15 Adicionalmente, se prefiere que el producto alimenticio comprenda al menos DHA, en el que al menos una reacción enzimática en la producción de DHA se realizó mediante una enzima recombinante en una célula.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para preparar un producto alimenticio, comprendiendo el método mezclar una célula de la invención, una planta de la invención, la semilla de la invención, o una composición de la invención, con un vehículo adecuado. Preferiblemente, el producto alimenticio es para consumo por un mamífero o un pez.

25 En un aspecto adicional, la presente especificación describe un método para incrementar los niveles de un LC-PUFA en un organismo, comprendiendo el método administrar al organismo 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 de la invención, o un producto alimenticio de la invención.

Preferiblemente, la ruta de administración es oral.

30 Preferiblemente, el organismo es un vertebrado. Más preferiblemente, el vertebrado es un ser humano, pez, animal de compañía o ganado.

35 En un aspecto adicional, la presente especificación describe un método para tratar o prevenir una afección que se beneficiaría de un LC-PUFA, comprendiendo el método administrar al sujeto 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 de la invención, o un producto alimenticio de la invención.

40 Preferiblemente, la afección es una arritmia, angioplastia, inflamación, asma, psoriasis, osteoporosis, piedras renales, SIDA, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, cáncer, síndrome de alcohol fetal, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistrofia, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, diabetes, obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, restenosis después de angioplastia, eccema, presión sanguínea alta, agregación plaquetaria, hemorragia gastrointestinal, endometriosis, síndrome premenstrual, encefalomiелitis miálgica, fatiga crónica después de infecciones virales o enfermedad ocular.

Aunque el proporcionar al sujeto cualquier cantidad de LC-PUFA será beneficioso para el sujeto, se prefiere administrar una cantidad efectiva para tratar la afección.

50 En otro aspecto, la presente especificación describe el uso de 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 de la invención, o un producto alimenticio de la invención, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección que se beneficiaría de un LC-PUFA.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula de acuerdo con la invención, una semilla de la invención, una planta de la invención o una composición de la invención, para su uso en terapia.

60 La $\Delta 6$ elongasa de *Caenorhabditis elegans* se ha expresado anteriormente en levaduras y se ha mostrado que convierte ácido octadecatetraenoico en ácido eicosatetraenoico. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que esta enzima también posee actividad $\Delta 5$ elongasa, siendo capaz de convertir ácido eicosapentaenoico en ácido docosapentaenoico.

65 En un aspecto adicional, la presente especificación describe un método para producir un LC-PUFA no ramificado que comprende 22 átomos de carbono, comprendiendo el método incubar un LC-PUFA no ramificado de 20 átomos de carbono con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:14,

5 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 14, y

iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido también tiene actividad $\Delta 6$ elongasa.

10 Preferiblemente, el LC-PUFA no ramificado que comprende 22 átomos de carbono es DPA, y el LC-PUFA no ramificado de 20 átomos de carbono es EPA.

Preferiblemente, el método se realiza en una célula recombinante que produce el polipéptido y EPA.

15 En un aspecto adicional más, la presente especificación describe un anticuerpo sustancialmente purificado, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un polipéptido de la invención.

En otro aspecto, la presente especificación describe un método de identificación de una célula, un tejido o un organismo recombinantes capaces de sintetizar uno o más LC-PUFA, comprendiendo el método detectar la presencia en dicha célula, tejido u organismo de uno o más polinucleótidos que codifican al menos dos enzimas cada una de las cuales es una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional, $\Delta 5$ desaturasa, $\Delta 6$ desaturasa, $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, $\Delta 5$ elongasa, $\Delta 6$ elongasa, $\Delta 4$ desaturasa, $\Delta 9$ elongasa o $\Delta 8$ desaturasa, en el que el uno o más polinucleótidos se unen de forma operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, el tejido o el organismo.

25 Preferiblemente, el método comprende una etapa de amplificación de ácido nucleico, una etapa de hibridación de ácido nucleico, una etapa de detectar la presencia de un transgén en la célula, el tejido o el organismo, o una etapa de determinar el contenido de ácido graso o la composición de la célula, el tejido o el organismo.

30 Preferiblemente, el organismo es un animal, una planta, una planta angiosperma o un microorganismo.

En otro aspecto, la presente especificación describe un método de producir DPA a partir de EPA, comprendiendo el método exponer EPA a una $\Delta 5$ elongasa de la invención y un precursor de ácido graso, en condiciones adecuadas.

35 Preferiblemente, el método se produce en una célula que usa el sistema tipo poliquétido para producir EPA.

Naturalmente, las células recombinantes (transgénicas), las plantas, los animales no humanos que comprenden un nuevo polinucleótido proporcionado en el presente documento también pueden producir otras elongasas y/o desaturasas tales como aquellas definidas anteriormente.

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

45 A lo largo de esta especificación, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número o etapa indicado, o grupo de elementos, números o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número o etapa, o grupo de elementos, números o etapas.

50 La invención se describe de aquí en adelante mediante los Ejemplos siguientes no limitativos y con referencia a las figuras adjuntas.

Descripción breve de los dibujos adjuntos

55 **Figura 1.** Rutas posibles de la síntesis de $\omega 3$ y $\omega 6$ LC-PUFA. Los sectores marcados I, II, III, y IV corresponden a las rutas $\omega 6$ ($\Delta 6$), $\omega 3$ ($\Delta 6$), $\omega 6$ ($\Delta 8$), y $\omega 3$ (Δ), respectivamente. Los compuestos en los sectores I y III son compuestos $\omega 6$, mientras aquellos en los sectores II y IV son compuestos $\omega 3$. "Des" se refiere a etapas de desaturasa en la ruta catalizadas por desaturasas como se indica, mientras "Elo" se refiere a etapas de elongasa catalizadas por elongasas como se indica. La flecha engrosada indica la etapa $\Delta 5$ elongasa. Las flechas discontinuas indican las etapas en la ruta "Sprecher" que opera en células de mamífero para la producción de DHA a partir de DPA.

60 **Figura 2.** Distribución de LC-PUFA en clases de microalgas. Chlorophyceae y Prasinophyceae se describen como "algas verdes", Eustigmatophyceae como "algas verde amarillentas", Rhodophyceae como "algas rojas", y Bacillariophyceae y Prymnesiophyceae como diatomeas y algas marrón dorado.

65 **Figura 3.** Construcción genética para la expresión de los genes de la biosíntesis de LC-PUFA en células de planta.

Figura 4. PILEUP de enzimas desaturasa. d8-atg - *Pavlova salina* $\Delta 8$ desaturasa; euglena - AAD45877 ($\Delta 8$)

desaturasa, *Euglena gracilis*); rhizopus - AAP83964 ($\Delta 6$ desaturasa, *Rhizopus sp.* NK030037); *mucor* - BAB69055 ($\Delta 6$ desaturasa, *Mucor circinelloides*); *mortierella* - AAL73948 ($\Delta 6$ desaturasa, *Mortierella isabellina*); *malpina* - BAA85588 ($\Delta 6$ desaturasa, *Mortierella alpina*); *physcomitrella* - CAA11032 ($\Delta 6$ acil-lípido desaturasa, *Physcomitrella patens*); *ceratodon* - CAB94992 ($\Delta 6$ ácido graso acetilénasa, *Ceratodon purpureus*).

Figura 5. Transferencia Southern de productos de PCR, hibridados con sondas Elo1 o Elo2.

Figura 6. PILEUP de enzimas elongasa.

Figura 7. Construcciones de transgén usadas para expresar genes que codifican enzimas biosintéticas de LC-PUFA en *Arabidopsis*. La "construcción EPA" pSSP-5/6D.6E (también denominada pZebdesatCeloPWvec8 en el Ejemplo 5) (Figura 7A) contenía la $\Delta 5/\Delta 6$ -desaturasa de función dual de pez cebra (D5/D6Des) y la $\Delta 6$ -elongate de nematodo (D6Elo) ambas dirigidas por el promotor napin truncado (Fp1), y el gen marcador seleccionable de resistencia a higromicina (hph) dirigido por el promotor CaMV-35S (35SP). La "construcción DHA" pXZP355 (Figura 7B) comprendía los genes de $\Delta 4$ -desaturasa (D4Des) y $\Delta 5$ -elongasa (D5Elo) de *Pavlova salina* ambos dirigidos por el promotor napin truncado (Fp1), y el gen marcador seleccionable de resistencia a kanamicina (nptII) dirigido por el promotor de nopalina sintasa (NosP). Todos los genes estaban flanqueados en el extremo 3' por el terminador de nopalina sintasa (NosT).

Figura 8. A. Cromatograma de gas (GLC) que muestra el perfil de ácidos grasos para *Arabidopsis thaliana* línea DO11 que porta las construcciones génicas EPA y DHA. B. Espectros de masas para EPA y DHA obtenidos de *Arabidopsis thaliana* línea DO11.

Figura 9. Autorradiogramas de hibridaciones sobre mancha realizadas en condiciones de astringencia baja o astringencia alta, como se describe en el Ejemplo 12, con ADN de varias especies de microalgas indicadas en la parte superior, usando sondas radiomarcadas que consisten en regiones codificadoras del gen de LC-PUFA de *P. salina* como se indica a la derecha.

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de $\Delta 6$ - y $\Delta 8$ -desaturasas de plantas superiores. Las secuencias de aminoácidos de $\Delta 6$ -desaturasas de *E. plantagineum* (Ep1D6Des) (SEQ ID NO:64), *E. gentianoideis* (EgeD6Des, número de registro AY055117) (SEQ ID NO:65), *E. pitardii* (EpiD6Des, AY055118) (SEQ ID NO:66), *Borago officinalis* (BofD6Des, U79010) (SEQ ID NO:67) y $\Delta 8$ -desaturasas de *B. officinalis* (BofD8Des, AF133728) (SEQ ID NO:68), *Helianthus annuus* (HanD8Des, S68358) (SEQ ID NO:69), y *Arabidopsis thaliana* (AtD8DesA, AAC62885.1; y AtD8DesB, CAB71088.1) (SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:71 respectivamente) se alinearon por PILEUP (GCG, Wisconsin, EEUU). HBI, HBII, HBIII son tres cajas de histidina conservadas. F1 y R1 son las regiones correspondientes para los cebadores degenerados EpD6Des-F1 y EpD6Des-R1 usados para amplificar el ADNc. También se indica el dominio N-terminal de citocromo b₅ con resto HPGG conservado.

Figura 11. Enzimas EpiD6Des variantes aisladas y actividades enzimáticas representativas. EpiD6Des con citocromo b₅, cajas de histidina I, II, y III se muestran como b₅, HBI, HBII, HBIII respectivamente. Las variantes aisladas se muestran en el panel A en el formato: aminoácido de tipo silvestre - número de la posición - aminoácido variante. Los diamantes vacíos indican mutantes con una reducción significativa de la actividad enzimática, mientras los diamantes llenos indican las variantes sin efecto significativo en la actividad de la enzima. El panel B muestra la comparación de la producción de GLA y SDA en hojas de tabaco transgénicas de dos variantes con la de la enzima de tipo silvestre.

Figura 12. Rutas alternativas para la síntesis del $\omega 3$ LC-PUFA SDA (18:4), EPA (20:5) y DHA (22:6) a partir de ALA (18:3). Las desaturasas, elongasas y aciltransferasas se muestran como flechas llenas, abiertas y discontinuas respectivamente. La elongación de la cadena ocurre solo en sustratos acil-CoA, mientras la desaturación puede ocurrir tanto en sustratos acil-PC [A y B] como acil-CoA [C]. La preferencia de sustrato acil-PC o acil-CoA de la etapa final de $\Delta 4$ -desaturasa no se ha determinado todavía. Las rutas que implican acil-PC desaturasas requieren el traslado mediado por aciltransferasa de grupos acilo entre los sustratos PC y CoA. Los paneles A y B muestran las variantes de la "ruta $\Delta 6$ " y la "ruta $\Delta 8$ " de la ruta acil-PC desaturasa respectivamente. El panel C muestra la ruta expresada en el estudio actual en la que las actividades acil-CoA $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa estaban codificadas por la $\Delta 6/\Delta 5$ desaturasa de función dual del pez cebra. La síntesis de $\omega 6$ LC-PUFA tal como ARA (20:4) ocurre por el mismo conjunto de reacciones pero comenzando con LA (18:2) como el sustrato inicial.

Figura 13. Velocidades de crecimiento de *Synechococcus* 7002 a 22 °C, 25 °C, 30 °C.

Figura 14. Niveles de ácido linoleico y linolénico de *Synechococcus* 7002 a varias temperaturas de crecimiento.

CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 - $\Delta 8$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:2 - $\Delta 5$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:3 - $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:4 - $\Delta 4$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:5 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 8$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:6 - ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 8$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:7 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 5$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:8 - ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 5$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:9 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:10 - ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:11 - ADNc parcial que codifica la parte N-terminal de $\Delta 4$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:12 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 4$ desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:13 - ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 4$ desaturasa de *Pavlova salina*.

- SEQ ID NO:14 - $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional de *Caenorhabditis elegans*.
 SEQ ID NO:15 - $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional de *Danio rerio* (pez cebra).
 SEQ ID NO:16 - $\Delta 5$ desaturasa de seres humanos (Registro Genbank No: AAF29378).
 SEQ ID NO:17 - $\Delta 5$ desaturasa de *Pythium irregulare* (Registro Genbank No: AAL13311).
 5 SEQ ID NO:18 - $\Delta 5$ desaturasa de *Thraustochytrium sp.* (Registro Genbank No: AAM09687).
 SEQ ID NO:19 - $\Delta 5$ desaturasa de *Mortierella alpina* (Registro Genbank No: 074212).
 SEQ ID NO:20 - $\Delta 5$ desaturasa de *Caenorhabditis elegans* (Registro Genbank No: T43319).
 SEQ ID NO:21 - $\Delta 6$ desaturasa de seres humanos (Registro Genbank No: AAD20018).
 SEQ ID NO:22 - $\Delta 6$ desaturasa de ratón (Registro Genbank No: NP_062673).
 10 SEQ ID NO:23 - $\Delta 6$ desaturasa de *Pythium irregulare* (Registro Genbank No: AAL13310).
 SEQ ID NO:24 - $\Delta 6$ desaturasa de *Borago officinalis* (Registro Genbank No: AAD01410).
 SEQ ID NO:25 - $\Delta 6$ desaturasa de *Anemone leveillei* (Registro Genbank No: AAQ10731).
 SEQ ID NO:26 - $\Delta 6$ desaturasa de *Ceratodon purpureus* (Registro Genbank No: CAB94993).
 SEQ ID NO:27 - $\Delta 6$ desaturasa de *Physcomitrella patens* (Registro Genbank No: CAA11033).
 15 SEQ ID NO:28 - $\Delta 6$ desaturasa de *Mortierella alpina* (Registro Genbank No: BAC82361).
 SEQ ID NO:29 - $\Delta 6$ desaturasa de *Caenorhabditis elegans* (Registro Genbank No: AAC15586).
 SEQ ID NO:30 - $\Delta 5$ elongasa de seres humanos (Registro Genbank No: NP_068586).
 SEQ ID NO:31 - $\Delta 6$ elongasa de *Physcomitrella patens* (Registro Genbank No: AAL84174).
 SEQ ID NO:32 - $\Delta 6$ elongasa de *Mortierella alpina* (Registro Genbank No: AAF70417).
 20 SEQ ID NO:33 - $\Delta 4$ desaturasa de *Thraustochytrium sp.* (Registro Genbank No: AAM09688).
 SEQ ID NO:34 - $\Delta 4$ desaturasa de *Euglena gracilis* (Registro Genbank No: AAQ19605).
 SEQ ID NO:35 - $\Delta 9$ elongasa de *Isochrysis galbana* (Registro Genbank No: AAL37626).
 SEQ ID NO:36 - $\Delta 8$ desaturasa de *Euglena gracilis* (Registro Genbank No: AAD45877).
 SEQ ID NO:37 - ADNc que codifica $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional de *Caenorhabditis elegans*.
 25 SEQ ID NO:38 - ADNc que codifica $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional de *Danio rerio* (pez cebra).
 SEQ ID NO's:39 a 42, 46, 47, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 81, 82, 83, 84 y 87 - Cebadores oligonucleotídicos.
 SEQ ID NO's:43 a 45, 48, 49 y 52 - Restos conservados de varias desaturasas/elongasas.
 SEQ ID NO:55 - ADNc parcial que codifica elongasa semejante a FAE de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO:58 - ADNc de longitud completa que codifica $\Delta 5$ desaturasa de *Pavlova salina*.
 30 SEQ ID NO:59 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 5$ desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO:60 - $\Delta 5$ desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO's 61 y 62 - Fragmentos de $\Delta 6$ desaturasa de *Echium pitardii*.
 SEQ ID NO:63 - ADNc que codifica marco de lectura abierto de $\Delta 6$ desaturasa de *Echium plantagineum*.
 SEQ ID NO:64 - $\Delta 6$ desaturasa de *Echium plantagineum*.
 35 SEQ ID NO:65 - $\Delta 6$ desaturasa de *Echium gentianoides* (Registro Genbank No: AY055117).
 SEQ ID NO:66 - $\Delta 6$ desaturasa de *Echium pitardii* (Registro Genbank No: AY055118).
 SEQ ID NO:67 - $\Delta 6$ desaturasa de *Borago officinalis* (Registro Genbank No: U79010).
 SEQ ID NO:68 - $\Delta 8$ desaturasa de *Borago officinalis* (Registro Genbank No: AF133728).
 SEQ ID NO:69 - $\Delta 8$ desaturasa de *Helianthus annuus* (Registro Genbank No: S68358).
 40 SEQ ID NO:70 - $\Delta 8$ desaturasaA de *Arabiposis thaliana* (Registro Genbank No: AAC62885.1).
 SEQ ID NO:71 - $\Delta 8$ desaturasaB de *Arabiposis thaliana* (Registro Genbank No: CAB71088.1).
 SEQ ID NO:72 y 73 - Restos conservados de $\Delta 6$ y $\Delta 8$ desaturasas.
 SEQ ID NO:74 - $\Delta 6$ elongasa de *Thraustochytrium sp.* (Registro Genbank No: AX951565).
 SEQ ID NO:75 - $\Delta 9$ elongasa de *Danio rerio* (Registro Genbank No: NM_199532).
 45 SEQ ID NO:76 - $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova lutheri*.
 SEQ ID NO:77 - $\Delta 5$ elongasa de *Danio rerio* (Registro Genbank No: AF532782).
 SEQ ID NO:78 - $\Delta 5$ elongasa de *Pavlova lutheri*.
 SEQ ID NO:79 - Secuencia génica parcial de *Heterocapsa niei* que codifica una elongasa.
 SEQ ID NO:80 - Proteína codificada por SEQ ID NO:79, la presencia de codón de parada sugiere un intrón en
 50 SEQ ID NO:79.
 SEQ ID NO:85 - $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova salina*, codificada por un codón de inicio alternativo en la posición 31 de
 SEQ ID NO:9.
 SEQ ID NO:86 - $\Delta 9$ elongasa de *Pavlova salina*, codificada por un codón de inicio alternativo en la posición 85 de
 SEQ ID NO:9.
 55 SEQ ID NO:88 - Secuencia de aminoácidos de elongasa parcial de *Melosira sp.*
 SEQ ID NO:89 - Secuencia de ADNc que codifica una elongasa parcial de *Melosira sp.*

Descripción detallada de la invención

60 Técnicas Generales y Definiciones

A no ser que se defina específicamente otra cosa, debe entenderse que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, biología de plantas, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, 65 química de proteínas, síntesis de ácidos grasos, y bioquímica).

A no ser que se indique otra cosa, el ácido nucleico recombinante, proteína recombinante, cultivo celular, y técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, muy conocidos para los expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen y explican en la bibliografía en fuentes tales como , J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and 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), y F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el momento), 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 momento).

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena larga", "LC-PUFA" o "ácido graso poliinsaturado C20+" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 20 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos tres enlaces dobles carbono-carbono. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga", "VLC-PUFA" o "ácido graso poliinsaturado C22+" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 22 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos tres enlaces dobles carbono-carbono. Habitualmente, el número de átomos de carbono en la cadena de carbono de los ácidos grasos se refiere a una cadena de carbono no ramificada. Si la cadena de carbono es ramificada, el número de átomos de carbono excluye aquellos en los grupos laterales. En una realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso $\omega 3$, esto es, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. En otra realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso $\omega 6$, esto es, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el sexto enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. En una realización adicional, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consiste en; ácido araquidónico (ARA, 20:4 Δ 5,8,11,14; $\omega 6$), ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 Δ 8,11,14,17, $\omega 3$) ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; $\omega 3$), ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 Δ 7,10,13,16,19, $\omega 3$), o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 Δ 4,7,10,13,16,19, $\omega 3$). El LC-PUFA también puede ser ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA) o ácido eicosatrienoico (ETra, 20:3 Δ 11,14,17, $\omega 3$). Será fácilmente aparente que el LC-PUFA que se produce según la invención puede ser una mezcla de cualquiera o todos los anteriores y puede incluir otro LC-PUFA o derivados de cualquiera de estos LC-PUFA. En una realización preferida, el ácido graso $\omega 3$ es EPA, DPA, o DHA, o incluso más preferiblemente DPA o DHA.

Además, tal y como se usan en la presente memoria los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" o "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" se refieren al ácido graso que está en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada como 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 formas fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol. Así, el LC-PUFA puede estar presente como una mezcla de formas en el lípido de una célula o un aceite purificado o lípido extraído de células, tejidos u organismos. En realizaciones preferidas, la invención proporciona aceite que comprende al menos 75 % o 85 % triacilgliceroles, con el resto presente como otras formas de lípido tales como las mencionadas, con al menos dichos triacilgliceroles comprendiendo el LC-PUFA. El aceite puede purificarse o tratarse adicionalmente, por ejemplo por hidrólisis con una base fuerte para liberar el ácido graso libre, o por fraccionamiento, destilación o semejantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, las abreviaturas "LC-PUFA" y "VLC-PUFA" pueden referirse a un único tipo de ácido graso, o a múltiples tipos de ácidos grasos. Por ejemplo, una planta transgénica de la invención que produce LC-PUFA puede producir EPA, DPA y DHA.

Las proteínas desaturasa y elongasa y los genes que las codifican que pueden usarse en la invención son cualquiera de aquellas conocidas en la técnica u homólogos o derivados de éstas. Los ejemplos de dichos genes y los tamaños de las proteínas codificadas se listan en la Tabla 1. Las enzimas desaturasas que se ha mostrado que participan en la biosíntesis LC-PUFA todas pertenecen al grupo denominado desaturasas "de extremo frontal " que se caracterizan por la presencia de un dominio semejante a citocromo b_5 en el extremo N de cada proteína.

55 TABLA 1. Genes clonados implicados en la biosíntesis de LC-PUFA.

Enzima	Tipo de organismo	Especie	Nos. de Registro	Tamaño de la proteína (aa's)	Referencias
$\Delta 4$ -desaturasa	Algas	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003
		<i>Pavlova lutherii</i>	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		<i>Thraustochytrium sp.</i>	AF489589	519	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>	AF391543-5	515	(NCBI)

ES 2 715 640 T3

$\Delta 5$ -desaturasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Nematodos	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF11440, NM_06935.0	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 tricomutum</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
$\Delta 6$ -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
		<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>			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 tricomutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Bacterias	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Algas	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	WO02081668
$\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional	Peces	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 $\Delta 8$ -desaturasa	Algas	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis y Browse, 1999
	Plantas	<i>Borago officinales</i>	AF133728		
$\Delta 6$ -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
	Gusano	<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> **		?	WO 03078639
$\Delta 9$ -elongasa	Algas	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** Función no probada/no demostrada. El dominio semejante a citocromo b₅ actúa presumiblemente como un receptor de electrones requerido para la desaturación (Napier et al., 1999; Sperling y Heinz, 2001).

5 La actividad de cualquiera de las elongasas o desaturasas para uso en la invención puede ensayarse expresando un gen que codifica la enzima en una célula tal como, por ejemplo, una célula de levadura o una célula vegetal, y determinando si la célula tiene una capacidad incrementada de producir LC-PUFA comparado con una célula comparable en la que la enzima no se expresa.

10 A no ser que se afirme lo contrario, las realizaciones de la presente invención que se refieren a células, plantas, semillas, etc. y a métodos para la producción de éstas, y que se refieren al menos a "dos enzimas" (o al menos "tres enzimas" etc) de la lista que se proporciona significa que los polinucleótidos codifican al menos dos enzimas "diferentes" de la lista proporcionada y no dos marcos de lectura abiertos idénticos (o muy similares con solo unas pocas diferencias de manera que no alteran sustancialmente la actividad de la enzima codificada) que codifican esencialmente la misma enzima.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, a no ser que se afirme lo contrario, el término "sustancialmente el mismo", o variaciones de éste, significa que dos muestras que se están analizando, por ejemplo dos semillas de diferentes fuentes, son sustancialmente la misma si solo varían aproximadamente +/-10 % en el rasgo que se está investigando.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "una enzima que convierte preferentemente un $\omega 6$ LC-PUFA en un $\omega 3$ LC-PUFA" significa que la enzima es más eficiente realizando dicha conversión lo que es realizando una reacción de desaturación indicada en las rutas II o III de la Figura 1.

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

Desaturasas

30 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional" o " $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa" es al menos capaz de i) convertir ácido α -linolénico en ácido octadecatetraenoico, y ii) convertir ácido eicosatetraenoico en ácido eicosapentaenoico. Esto es, una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional es tanto una $\Delta 5$ desaturasa como una $\Delta 6$ desaturasa, y las $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasas bifuncionales pueden considerarse una sub-clase de cada una de éstas. Un gen que codifica una $\Delta 5$ -/ $\Delta 6$ - desaturasa bifuncional se ha identificado en el pez cebra (Hasting et al., 2001). El gen que codifica esta enzima podría representar una forma ancestral de la "desaturasa de extremo frontal " que

posteriormente se duplicó y las copias desarrollaron distintas funciones $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasa. En una realización, la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional se produce naturalmente por una especie de pez de agua dulce. En una realización particular, la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional comprende

- 5 i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:15,
- ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO: 15, o
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

10 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 5$ desaturasa" es al menos capaz de convertir ácido eicosatetraenoico en ácido eicosapentaenoico. En una realización, la enzima $\Delta 5$ desaturasa cataliza la desaturación de C20 LC-PUFA, convirtiendo DGLA en ácido araquidónico (ARA, 20:4 ω 6) y ETA en EPA (20:5 ω 3). Los genes que codifican esta enzima se han aislado de varios organismos, incluyendo algas (*Thraustochytrium sp.* Qiu et al., 2001), hongos (*M. alpine*, *Pythium irregulare*, *P. tricornutum*, *Dictyostelium*), *Caenorhabditis elegans* y mamíferos (Tabla 1).
 15 En otra realización, la $\Delta 5$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:60, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:60, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 5$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:60, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 o SEQ ID NO:60, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 5$ desaturasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 5$ desaturasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 6$ desaturasa" es al menos capaz de convertir ácido α -linolénico en ácido octadecatetraenoico. En una realización, la enzima $\Delta 6$ desaturasa cataliza la desaturación de C18 LC-PUFA, convirtiendo LA en GLA y ALA en SDA. En otra realización, la $\Delta 6$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:64 SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 o SEQ ID NO:67, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:64 SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 o SEQ ID NO:67, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 6$ desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:64 SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 o SEQ ID NO:67. En una realización adicional, la $\Delta 6$ desaturasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 6$ desaturasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 4$ desaturasa" es al menos capaz de convertir ácido docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico. La etapa de desaturación para producir DHA a partir de DPA está catalizada por una $\Delta 4$ desaturasa en organismos distintos de mamíferos, y un gen que codifica esta enzima se ha aislado de la especie de protista de agua dulce *Euglena gracilis* y la especie marina *Thraustochytrium sp.* (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). En una realización, la $\Delta 4$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 4$ desaturasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 4$ desaturasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 8$ desaturasa" es al menos capaz de convertir 20:3 $\Delta^{11,14,17}$ ω 3 en ácido eicosatetraenoico. En una realización, la $\Delta 8$ desaturasa es relativamente específica para sustratos $\Delta 8$. Esto es, tiene una actividad mayor desaturando sustratos $\Delta 8$ que otros sustratos, en particular sustratos desaturados $\Delta 6$. En una realización preferida, la $\Delta 8$ desaturasa tiene poca o ninguna actividad $\Delta 6$ desaturasa cuando se expresa en células de levadura. En otra realización, la $\Delta 8$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 o SEQ ID NO:71, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70 o SEQ ID NO:71, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 8$ desaturasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:1, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:1, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

65 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\omega 3$ desaturasa" es al menos capaz de convertir LA en ALA y/o GLA en SDA y/o ARA en EPA. Los ejemplos de $\omega 3$ desaturasa incluyen los descritos por Pereira et al. (2004), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) y Spsychalla et al. (1997). En una realización, una célula de la invención es una célula vegetal que carece de actividad $\omega 3$ desaturasa. Dichas células pueden producirse usando tecnología de inactivación génica muy conocida en la técnica. Estas células pueden usarse para producir específicamente grandes

cantidades de $\omega 6$ LC-PUFA tal como DGLA.

Elongasas

5 La evidencia bioquímica sugiere que la elongación de ácidos grasos consiste en 4 etapas: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. En el contexto de esta invención, una "elongasa" se refiere al polipéptido que cataliza la etapa de condensación en presencia de los demás miembros del complejo de elongación, en condiciones fisiológicas adecuadas. Se ha mostrado que solo se requiere la expresión heteróloga u homóloga en una célula del componente de condensación ("elongasa") del complejo proteico de elongación para la elongación de la cadena acilo respectiva. Así, la elongasa introducida es capaz de reclutar con éxito las actividades de reducción y deshidratación del huésped transgénico para llevar a cabo las elongaciones de acilo con éxito. Se piensa que la especificidad de la reacción de elongación respecto a la longitud de la cadena y el grado de desaturación de los sustratos ácido graso reside en el componente de condensación. También se piensa que este componente es limitante de la velocidad en la reacción de elongación.

15 Hasta ahora se han identificado dos grupos de enzimas de condensación. El primero está implicado en la extensión de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (C18-22) tales como, por ejemplo, el gen FAE1 de *Arabidopsis*. Un ejemplo de un producto formado es ácido erúxico (22:1) en *Brassicas*. Este grupo se designa enzimas semejantes a FAE y no parece que tengan un papel en la biosíntesis de LC-PUFA. La otra clase identificada de elongasas de ácidos grasos, designada la familia ELO de elongasas, se denominan como los genes ELO cuyas actividades se requieren para la síntesis de los ácidos grasos de cadena muy larga de esfingolípidos en levaduras. Se ha mostrado que los parálogos aparentes de las elongasas de tipo ELO aislados de los organismos que sintetizan LC-PUFA como algas, musgos, hongos y nematodos están implicados en la elongación y síntesis de LC-PUFA. También se han aislado varios genes que codifican dichas enzimas de elongación PUFA (Tabla 1). Dichos genes no están relacionados en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos con los genes de elongasa semejantes a FAE presentes en las plantas superiores.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional" o " $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa" es al menos capaz de i) convertir ácido octadecatetraenoico en ácido eicosatetraenoico, y ii) convertir ácido eicosapentaenoico en ácido docosapentaenoico. Esto es, una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional es tanto una $\Delta 5$ elongasa como una $\Delta 6$ elongasa, y las $\Delta 5/\Delta 6$ elongasas bifuncionales pueden considerarse una sub-clase de cada una de éstas. En una realización, la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional es capaz de catalizar la elongación de EPA para formar DPA en una célula vegetal tal como, por ejemplo, una célula vegetal superior, cuando se proporciona a esta célula una fuente de EPA. El EPA puede proporcionarse exógenamente o preferiblemente endógenamente. Un gen que codifica dicha elongasa se ha aislado de un invertebrado, *C. elegans* (Beaudoin et al., 2000) aunque no se conocía anteriormente que catalizara la etapa de $\Delta 5$ -elongación. En una realización, la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa es relativamente específica para sustratos de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:14, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:14, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

40 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 5$ elongasa" es al menos capaz de convertir ácido eicosapentaenoico en ácido docosapentaenoico. En una realización la $\Delta 5$ elongasa es de una fuente de no vertebrado tal como, por ejemplo, una fuente de alga o fúngica. Dichas elongasas pueden tener ventajas en términos de la especificidad de las reacciones de elongación llevadas a cabo (por ejemplo, la $\Delta 5$ elongasa proporcionada como SEQ ID NO:2). En una realización preferida, la $\Delta 5$ elongasa es relativamente específica para sustratos C20 sobre sustratos C22. Por ejemplo, puede tener al menos una actividad 10 veces menor frente a sustratos C22 (elongados a ácidos grasos C24) respecto a la actividad frente a un sustrato C20 correspondiente cuando se expresa en células de levadura. Se prefiere que la actividad cuando se usa sustratos C20 $\Delta 5$ desaturados sea alta, tal como por ejemplo, proporcionando una eficiencia para la conversión de 20:5 ω 3 en 22:5 ω 3 de al menos 7 % cuando se expresa en células de levadura. En otra realización, la $\Delta 5$ elongasa es relativamente específica para sustratos $\Delta 5$ desaturados sobre sustratos $\Delta 6$ desaturados. Por ejemplo, puede tener al menos una actividad 10 veces menor frente a sustratos C18 $\Delta 6$ desaturados respecto a sustratos C20 $\Delta 5$ desaturados cuando se expresa en células de levadura. En una realización más, la $\Delta 5$ elongasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:77 o SEQ ID NO:78, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:77 o SEQ ID NO:78, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En otra realización, la $\Delta 5$ elongasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:2, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 5$ elongasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 5$ elongasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos.

60 Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 6$ elongasa" es al menos capaz de convertir ácido octadecatetraenoico en ácido eicosatetraenoico. En una realización, la $\Delta 6$ elongasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:88, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:88, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En otra realización, la $\Delta 6$ elongasa comprende (i) una

secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:88, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:88, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 6$ elongasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 6$ elongasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos.

En algunas especies de protistas, LC-PUFA se sintetizan por elongación de ácido linoleico o ácido α -linolénico con una unidad C2, antes de la desaturación con $\Delta 8$ desaturasa (Figura 1 parte IV; ruta "desaturación $\Delta 8$ "). Las actividades $\Delta 6$ desaturasa y $\Delta 6$ elongasa no se detectaron en estas especies. En lugar de esto, se esperaría una actividad $\Delta 9$ -elongasa en dichos organismos, y apoyando esto, se ha aislado recientemente un gen C18 $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana* (Qi et al., 2002). Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 9$ elongasa" es al menos capaz de convertir ácido α -linolénico en $20:3\Delta^{11,14,17}\omega 3$. En una realización, la $\Delta 9$ elongasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En otra realización, la $\Delta 9$ elongasa comprende (i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 9$ elongasa está codificada por la región codificadora de proteína de uno de los genes de $\Delta 9$ elongasa listados en la Tabla 1 o gen sustancialmente idéntico de éstos. En otra realización, la $\Delta 9$ elongasa también tiene actividad $\Delta 6$ elongasa. La elongasa en esta realización es capaz de convertir SDA en ETA y/o GLA en DGLA (actividad $\Delta 6$ elongasa) además de convertir ALA en ETrA ($\Delta 9$ elongasa). En una realización preferida, dicha elongasa es de una fuente de alga o fúngica tal como, por ejemplo, el género *Pavlova*.

Tal y como se usa en la presente memoria, una " $\Delta 4$ elongasa" es al menos capaz de convertir ácido docosahexaenoico en $24:6\Delta^{6,9,12,15,18,21}\omega 3$.

Células

Las células adecuadas de la invención incluyen cualquier célula vegetal que pueda transformarse con un polinucleótido que codifique un polipéptido/enzima descrito en la presente memoria, y que es capaz de esta manera de ser usada para producir LC-PUFA. Las células de planta huésped en las que se introducen el o los polinucleótidos pueden ser bien células no transformadas o células que ya se han transformado con al menos una molécula de ácido nucleico. Dicha molécula de ácido nucleico puede estar relacionada con la síntesis de LC-PUFA, o no relacionada. Las células huésped de la presente invención pueden ser capaces de producir endógenamente (es decir, naturalmente) proteínas de la presente invención o pueden ser capaces de producir dichas proteínas solo después de haber sido transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "célula con una capacidad aumentada de sintetizar un ácido graso poliinsaturado de cadena larga" es un término relativo en el que la célula recombinante de la invención se compara con la célula nativa, con la célula recombinante produciendo más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, o una mayor concentración de LC-PUFA tal como EPA, DPA o DHA (respecto a otros ácidos grasos), que la célula nativa.

Las células huésped de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína descrita en la presente memoria. En una realización preferida, las células de planta son células de semilla.

Hasta la fecha la evidencia sugiere que algunas desaturasas expresadas heterológicamente en levaduras tienen una actividad relativamente baja en combinación con algunas elongasas. Sin embargo, los presentes inventores han identificado que esto puede aliviarse 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 piensa que esto es ventajoso también en células recombinantes distintas de levaduras. A este respecto, también se ha determinado que las desaturasas de origen vertebrado son particularmente útiles para la producción de LC-PUFA. Así, en realizaciones de la invención, bien (i) al menos una de las enzimas es una $\Delta 5$ elongasa que cataliza la conversión de EPA en DPA en la célula, (ii) al menos una de las desaturasas es capaz de actuar sobre un sustrato acil-CoA, (iii) al menos una desaturasa es de vertebrado o es una variante de ésta, o (iv) una combinación de ii) y iii).

Según la invención, la célula huésped es una célula vegetal, tal como las descritas con mayor detalle en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "célula progenitora de una semilla" es una célula que se divide y/o diferencia en una célula de una semilla transgénica de la invención, y/o una célula que se divide y/o diferencia en una planta transgénica que produce una semilla transgénica de la invención.

Niveles de LC-PUFA producido

Los niveles del LC-PUFA que se producen en la célula vegetal recombinante son importantes. Los niveles pueden expresarse como una composición (en porcentaje) del ácido graso total que es un LC-PUFA particular o un grupo de LC-PUFA relacionados, por ejemplo, el ω 3 LC-PUFA o el ω 6 LC-PUFA, o el C22+ PUFA, u otro que puede determinarse por métodos conocidos en la técnica. El nivel también puede expresarse como un 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 del peso seco de la semilla que es LC-PUFA. Se apreciará que el LC-PUFA que se produce en una semilla oleaginosa puede ser considerablemente mayor en términos de contenido de LC-PUFA que en un vegetal o un grano que no se crece para la producción de aceite, aunque ambos pueden tener composiciones similares de LC-PUFA, y ambos pueden usarse como fuentes de LC-PUFA para consumo humano o animal.

Los niveles de LC-PUFA pueden determinarse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el lípido total puede extraerse de las células, tejidos u organismos y el ácido graso convertirse en ésteres de metilo antes del análisis por cromatografía de gases (GC). Dichas técnicas se describen en el Ejemplo 1. La posición del pico en el cromatograma puede usarse para identificar cada ácido graso particular, y el área bajo cada pico integrarse para determinar la cantidad. Tal y como se usa en la presente memoria, a no ser que se afirme lo contrario, el porcentaje de ácido graso particular en una muestra se determina como el área bajo el pico para ese ácido graso como un porcentaje del área total para ácidos grasos en el cromatograma. Esto corresponde esencialmente a un porcentaje en peso (p/p). La identidad de los ácidos grasos puede confirmarse por GC-MS, como se describe en el Ejemplo 1.

En otras realizaciones, el ácido graso total de la célula recombinante puede comprender al menos 1,5 % EPA, preferiblemente al menos 2,1 % EPA, y más preferiblemente al menos 2,5 %, al menos 3,1 %, al menos 4 % o al menos 5,1 % EPA.

En realizaciones adicionales, cuando la célula recombinante es una célula vegetal y se produce DPA, el ácido graso total en la célula puede comprender al menos 0,1 % DPA, preferiblemente al menos 0,13 % o al menos 0,15 % y más preferiblemente al menos 0,5 % o al menos 1 % DPA.

En realizaciones adicionales, el ácido graso total de la célula puede comprender al menos 2 % C20 LC-PUFA, preferiblemente al menos 3 % o al menos 4 % C20 LC-PUFA, más preferiblemente al menos 4,7 % o al menos 7,9 % C20 LC-PUFA y lo más preferiblemente al menos 10,2 % C20 LC-PUFA.

En realizaciones adicionales, el ácido graso total de la célula puede comprender al menos 2,5 % C20 ω 3 LC-PUFA, preferiblemente al menos 4,1 % o más preferiblemente al menos 5 % C20 ω 3 LC-PUFA.

En otras realizaciones, en las que tanto EPA como DPA se sintetizan en una célula, el nivel de EPA alcanzado es al menos 1,5 %, al menos 2,1 % o al menos 2,5 % y el nivel de DPA al menos 0,13 %, al menos 0,5 % o al menos 1,0 %.

En cada una de estas realizaciones, la célula recombinante es una célula vegetal. En una realización preferida, la célula es una célula de una angiosperma (planta superior). En una realización preferida más, la célula es una célula en una semilla tal como, por ejemplo, una semilla oleaginosa o un grano o cereal.

El nivel de producción de LC-PUFA en la célula recombinante también puede expresarse como una proporción de conversión, es decir, la cantidad del LC-PUFA formado como un porcentaje de uno o más sustrato PUFA o LC-PUFA. Respecto a EPA, por ejemplo, esto puede expresarse como la proporción del nivel de EPA (como un porcentaje en el ácido graso total) respecto al nivel de un ácido graso sustrato (ALA, SDA, ETA o ETrA). En una realización preferida, la eficiencia de la conversión es para ALA a EPA. En realizaciones particulares, la proporción de conversión para la producción de EPA en una célula recombinante puede ser al menos 0,5 %, al menos 1 %, o al menos 2 %. En otra realización, la eficiencia de la conversión para ALA en EPA es al menos 14,6 %. En realizaciones adicionales, la proporción de conversión para la producción de DPA a partir de EPA en una célula recombinante es al menos 5 %, al menos 7 %, o al menos 10 %. En otras realizaciones, los ácidos grasos ω 3 totales producidos que son productos de Δ 6 desaturación (es decir, aguas abajo de 18:3 ω 3 (ALA), calculados como la suma de los porcentajes para 18:4 ω 3 (SDA), 20:4 ω 3 (ETA), 20:5 ω 3 (EPA) y 22:5 ω 3 (DPA)) es al menos 4,2 %. En una realización particular, la eficiencia de la conversión de ALA en productos ω 3 a través de una etapa de Δ 6 desaturación y/o una etapa de Δ 9 elongación en una célula recombinante, preferiblemente una célula vegetal, más preferiblemente una célula de semilla, es al menos 22 % o al menos 24 %. Dicho de otra manera, en esta realización la proporción de productos derivados de ALA en ALA (productos:ALA) en la célula es al menos 1:3.6.

El contenido del LC-PUFA en la célula recombinante puede maximizarse si la célula parental usada para la introducción de los genes se elige de tal manera que el nivel de sustrato ácido graso que se produce o proporciona exógenamente es óptimo. En realizaciones particulares, la célula produce ALA endógenamente a niveles de al menos 30 %, al menos 50 %, o al menos 66 % del ácido graso total. El nivel de LC-PUFA también puede maximizarse creciendo o incubando las células en condiciones óptimas, por ejemplo a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura estándar para esa célula, lo que se piensa que favorece la acumulación de ácido graso

poliinsaturado.

5 Existen ventajas en maximizar la producción de un LC-PUFA deseado mientras se minimiza el grado de reacciones secundarias. En una realización particular, hay poco o nada de ETrA detectado (menos de 0,1 %) mientras el nivel de EPA es al menos 2,1 %.

10 Cambiando a las plantas transgénicas de la invención, en una realización, al menos una parte de planta sintetiza EPA, en el que el ácido graso total de la parte de planta comprende al menos 1,5 %, al menos 2,1 %, o al menos 2,5 % EPA.

En otra realización, al menos una parte de planta sintetiza DPA, en el que el ácido graso total de la parte de planta comprende al menos 0,1 %, al menos 0,13 %, o al menos 0,5 % DPA.

15 En una realización más, al menos una parte de planta sintetiza DHA.

En otra realización, al menos una parte de planta sintetiza DHA, en el que el ácido graso total de la parte de planta comprende al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, o al menos 0,5 % DHA.

20 En otra realización, al menos una parte de planta sintetiza al menos un ω 3 C20 LC-PUFA, en el que el ácido graso total de la parte de planta comprende al menos 2,5 %, o al menos 4,1 % ω 3 C20 LC-PUFA.

En otra realización más, al menos una parte de planta sintetiza EPA, en el que la eficiencia de la conversión de ALA en EPA en la parte de planta es al menos 2 % o al menos 14,6 %.

25 En una realización más, al menos una parte de planta sintetiza ácidos grasos poliinsaturados ω 3 que son productos de Δ 6-desaturación de ALA y/o los productos de Δ 9 elongación de ALA, en el que la eficiencia de la conversión de ALA en dichos productos en la parte de la planta es al menos 22 % o al menos 24 %.

30 En otra realización más, al menos una parte de planta sintetiza DPA a partir de EPA, en el que la eficiencia de la conversión de EPA en DPA en la parte de planta es al menos 5 % o al menos 7 %.

Respecto a las semillas transgénicas de la invención, en una realización EPA se sintetiza en la semilla y el ácido graso total de la semilla comprende al menos 1,5 %, al menos 2,1 %, o al menos 2,5 % EPA.

35 En otra realización, DPA se sintetiza en la semilla y el ácido graso total de la semilla comprende al menos 0,1 %, al menos 0,13 %, o al menos 0,5 % DPA.

En una realización más, DHA se sintetiza en la semilla.

40 En otra realización, DHA se sintetiza en la semilla y el ácido graso total de la semilla comprende al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, o al menos 0,5 % DHA.

45 En todavía una realización más, al menos un ω 3 C20 LC-PUFA se sintetiza en la semilla y el ácido graso total de la semilla comprende al menos 2,5 %, o al menos 4,1 % ω 3 C20 LC-PUFA.

En una realización más, EPA se sintetiza en la semilla y la eficiencia de la conversión de ALA en EPA en la semilla es al menos 2 % o al menos 14,6 %.

50 En otra realización, los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 que son productos de Δ 6-desaturación de ALA y/o los productos de Δ 9 elongación de ALA, se sintetizan en la semilla, y la eficiencia de la conversión de ALA en dichos productos en la semilla es al menos 22 % o al menos 24 %.

55 En una realización más, DPA se sintetiza a partir de EPA en la semilla y la eficiencia de la conversión de EPA en DPA en la semilla es al menos 5 % o al menos 7 %.

Respecto a los extractos descritos en la presente memoria, en un aspecto, el contenido de ácido graso total del extracto comprende al menos 1,5 %, al menos 2,1 %, o al menos 2,5 % EPA.

60 En otro aspecto, el contenido de ácido graso total del extracto comprende al menos 0,1 %, al menos 0,13 %, o al menos 0,5 % DPA.

En un aspecto más, el extracto comprende DHA.

65 En otro aspecto, el contenido de ácido graso total del extracto comprende al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, o al menos 0,5 % DHA.

En otro aspecto, el contenido de ácido graso total del extracto comprende al menos 2,5 %, o al menos 4,1 % ω 3 C20 LC-PUFA.

5 En todavía un aspecto más, el extracto comprende ARA, EPA, DPA, DHA, o cualquier mezcla de éstos en los triacilgliceroles.

Respecto a los métodos de la invención para producir DPA, en una realización, la célula comprende al menos un C20 LC-PUFA, y el ácido graso total de la célula comprende al menos 2 %, al menos 4,7 %, o al menos 7,9 % C20 LC-PUFA.

10 En otra realización, la célula comprende al menos un ω 3 C20 LC-PUFA y el ácido graso total de la célula comprende al menos 2,5 %, o al menos 4,1 % ω 3 C20 LC-PUFA.

15 En una realización más, la célula comprende ácidos grasos poliinsaturados ω 3 que son los productos de Δ 6-desaturación de ALA y/o los productos de Δ 9 elongación de ALA, y la eficiencia de la conversión de ALA en dichos productos en la célula es al menos 22 % o al menos 24 %.

20 En otra realización más, la célula comprende DPA, y el ácido graso total de la célula comprende al menos 0,1 %, al menos 0,13 %, o al menos 0,5 % DPA.

En una realización más, la célula comprende DPA, y la eficiencia de la conversión de EPA en DPA en la célula es al menos 5 % o al menos 7 %.

25 En otra realización, la célula comprende EPA, y en el que el ácido graso total de la célula comprende al menos 1,5 %, al menos 2,1 %, o al menos 2,5 % EPA.

En una realización más, la célula comprende EPA, y la eficiencia de la conversión de ALA en EPA en la célula es al menos 2 % o al menos 14,6 %.

30 Polipéptidos

En un aspecto, la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:1,
 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40 % idéntica a SEQ ID NO: 1,
 y
 iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

40 en el que el polipéptido tiene actividad Δ 8 desaturasa.

Preferiblemente, la Δ 8 desaturasa no tiene también actividad Δ 6 desaturasa.

45 En otro aspecto, la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- 50 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2,
 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 % idéntica a SEQ ID NO:2,
 y
 iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad Δ 5 elongasa y/o Δ 6 elongasa.

55 Preferiblemente, el polipéptido tiene actividad Δ 5 elongasa y Δ 6 elongasa, y en el que el polipéptido es más eficiente sintetizando DPA a partir de EPA de lo que es sintetizando ETA a partir de SDA. Más preferiblemente, el polipéptido puede purificarse de algas. Además, cuando se expresa en células de levadura, es más eficiente elongando C20 LC-PUFA que C22 LC-PUFA.

60 En otro aspecto, la especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- 65 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86,
 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40 % idéntica a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86, y
 iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad $\Delta 9$ elongasa y/o $\Delta 6$ elongasa.

Preferiblemente, el polipéptido tiene actividad $\Delta 9$ elongasa y $\Delta 6$ elongasa. Preferiblemente, el polipéptido es más eficiente para sintetizar ETrA a partir de ALA de lo que es para sintetizar ETA a partir de SDA. Además, se prefiere que el polipéptido pueda purificarse de algas u hongos.

En otro aspecto más, la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:4,
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a SEQ ID NO:4,
- y
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad $\Delta 4$ desaturasa.

En otro aspecto más, la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:60,
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 55 % idéntica a SEQ ID NO:60,
- y
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad $\Delta 5$ desaturasa.

En otro aspecto más, también la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:64,
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:64,
- y
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad $\Delta 6$ desaturasa.

En otro aspecto más, la presente especificación describe un polipéptido sustancialmente purificado seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:88,
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 76 % idéntica a SEQ ID NO:88,
- y
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii),

en el que el polipéptido tiene actividad $\Delta 6$ elongasa.

Preferiblemente, en relación con uno cualquiera de los aspectos anteriores, se prefiere que el polipéptido pueda aislarse de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Pavlova* y *Melosira*.

Por "polipéptido sustancialmente purificado" queremos decir un polipéptido que se ha separado al menos parcialmente de los lípidos, ácidos nucleicos, otros polipéptidos, y otras moléculas contaminantes con las que está asociado en su estado nativo. Preferiblemente, el polipéptido sustancialmente purificado carece al menos de 60 %, preferiblemente carece al menos de 75 %, y lo más preferiblemente carece al menos de 90 % de otros componentes con los que está asociado naturalmente. Además, el término "polipéptido" se usa indistintamente en la presente memoria con el término "proteína".

El % de identidad de un polipéptido se determina por análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco=5, y una penalización por extensión de hueco=0,3. A no ser que se afirme otra cosa, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Incluso más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos.

Respecto a los polipéptidos/enzimas definidos, se apreciará que los valores de % de identidad más altos que los

proporcionados anteriormente englobarán realizaciones preferidas. Así, cuando es aplicable, a la luz de los valores de % identidad mínimos, se prefiere que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 76 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 91 %, más preferiblemente al menos 92 %, más preferiblemente al menos 93 %, más preferiblemente al menos 94 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 %, más preferiblemente al menos 99,1 %, más preferiblemente al menos 99,2 %, más preferiblemente al menos 99,3 %, más preferiblemente al menos 99,4 %, más preferiblemente al menos 99,5 %, más preferiblemente al menos 99,6 %, más preferiblemente al menos 99,7 %, más preferiblemente al menos 99,8 %, e incluso más preferiblemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO nominada relevante.

En una realización más, la presente especificación describe polipéptidos que son sustancialmente idénticos a los descritos específicamente en la presente memoria. Tal y como se usa en la presente memoria, con referencia a un polipéptido el término "sustancialmente idéntico" significa la delección, inserción y/o sustitución de uno o unos pocos (por ejemplo, 2, 3, o 4) aminoácidos mientras se mantiene al menos una actividad de la proteína nativa.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmento biológicamente activo" se refiere a una parte del polipéptido/enzima definido que todavía mantiene actividad desaturasa o elongasa (la que sea relevante). Dichos fragmentos biológicamente activos pueden determinarse fácilmente por delecciones seriadas de la proteína de longitud completa, y ensayo de la actividad del fragmento resultante.

Los mutantes/variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos/enzimas definidos en la presente memoria pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en los nucleótidos en un ácido nucleico que codifica el polipéptido, o por síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Dichos mutantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos. Puede hacerse una combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que el producto de proteína final posea las características deseadas.

En el diseño de mutantes de la secuencia de aminoácidos, la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la o las características que se quieren modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservativas y después con selecciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos, (2) deleccionando el residuo diana, o (3) insertando otros residuos adyacentes al sitio localizado.

Las delecciones en la secuencia de aminoácidos varían generalmente de aproximadamente 1 a 30 residuos, más preferiblemente aproximadamente 1 a 10 residuos y normalmente aproximadamente 1 a 5 residuos contiguos.

Los mutantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de polipéptido eliminado y un residuo diferente insertado en su sitio. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen sitios identificados como el o los sitios activos o de unión. Otros sitios de interés son aquellos en los que son idénticos los residuos particulares obtenidos de varias cepas o especies. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquellos que se encuentren en una secuencia de al menos tres sitios idénticamente conservados diferentes, se sustituyen preferiblemente de una manera relativamente conservativa. Dichas sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 2.

Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no naturales o análogos químicos de aminoácidos como una sustitución o adición en los polipéptidos de la presente invención. Dichos aminoácidos incluyen, pero no están limitados a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, C α -metil aminoácidos, N α -metil aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

También se describen en la presente memoria polipéptidos que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para incrementar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido.

TABLA 2. Ejemplo de sustituciones

Residuo Original	Ejemplo 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

Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden producirse de varias maneras, incluyendo producción y recuperación de proteínas naturales, producción y recuperación de proteínas recombinantes, y síntesis química de las proteínas. En una realización, se produce un polipéptido aislado cultivando una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones efectivas para producir el polipéptido, y recuperando el polipéptido. Una célula preferida para cultivar es una célula vegetal recombinante de la presente invención. Las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no están limitadas a, medios efectivos, condiciones de biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. Un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el que una célula se cultiva para producir un polipéptido como se describe en la presente memoria. Dicho medio comprende normalmente un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces con agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación, y placas petri. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

Polinucleótidos

En un aspecto, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

En otro aspecto, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 51 % idéntica a SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

En otro aspecto más, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 51 % idéntica a SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

En una realización preferida, la secuencia que codifica el polipéptido son los nucleótidos 31 a 915 de SEQ ID NO:9 o los nucleótidos 85 a 915 de SEQ ID NO:9.

5 En un aspecto más, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- 10 iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 70 % idéntica a SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

15 En otro aspecto, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:59;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- 20 iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 55 % idéntica a SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:59; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

En otro aspecto, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:63;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO:63; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

30 En otro aspecto, la presente especificación describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:89;
- ii) una secuencia que codifica un polipéptido de la invención;
- 35 iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 76 % idéntica a SEQ ID NO:89; y
- iv) una secuencia que hibrida con una cualquiera de i) a iii) en condiciones de astringencia alta.

Los presentes inventores también son los primeros en aislar un polinucleótido que codifica una elongasa de ácido graso semejante a una cetó-acil sintasa a partir de una planta no superior.

40 De acuerdo con esto, en un aspecto adicional la presente especificación describe también se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 45 i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:55;
- ii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 40 % idéntica a SEQ ID NO:55; y
- iii) una secuencia que hibrida con i) o ii) en condiciones de astringencia alta.

50 Por un "polinucleótido aislado", incluyendo ADN, ARN, o una combinación de éstos, monocatenario o bicatenario, en la orientación con sentido o antisentido o una combinación de ambas, ARNs u otra, queremos decir un polinucleótido que está al menos parcialmente separado de las secuencias de polinucleótido con las que está asociado o ligado en su estado nativo. Preferiblemente, el polinucleótido aislado carece al menos de 60 %, preferiblemente carece al menos de 75 %, y lo más preferiblemente carece al menos de 90 % de otros componentes con los que está asociado naturalmente. Además, el término "polinucleótido" se usa indistintamente en la presente memoria con el término "molécula de ácido nucleico".

55 El % de identidad de un polinucleótido se determina por análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco=5, y una penalización por extensión de hueco=0,3. A no ser que se afirme otra cosa, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 45 nucleótidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 45 nucleótidos. Preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 150 nucleótidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 150 nucleótidos. Más preferiblemente, la secuencia de búsqueda tiene una longitud de al menos 300 nucleótidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 300 nucleótidos.

65 Respecto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que los valores de % de identidad más altos que los proporcionados anteriormente englobarán realizaciones preferidas. Así, cuando es aplicable, a la luz de los valores

de % identidad mínimos, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 %, más preferiblemente al menos 65 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 76 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 91 %, más preferiblemente al menos 92 %, más preferiblemente al menos 93 %, más preferiblemente al menos 94 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 %, más preferiblemente al menos 99,1 %, más preferiblemente al menos 99,2 %, más preferiblemente al menos 99,3 %, más preferiblemente al menos 99,4 %, más preferiblemente al menos 99,5 %, más preferiblemente al menos 99,6 %, más preferiblemente al menos 99,7 %, más preferiblemente al menos 99,8 %, e incluso más preferiblemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO nominada relevante.

En una realización más, la presente especificación describe polinucleótidos que son sustancialmente idénticos a los descritos específicamente en la presente memoria. Tal y como se usa en la presente memoria, con referencia a un polinucleótido el término "sustancialmente idéntico" significa la sustitución de uno o unos pocos (por ejemplo, 2, 3, o 4) nucleótidos mientras se mantiene al menos una actividad de la proteína nativa codificada por el polinucleótido. Además, este término incluye la adición o deleción de nucleótidos que resulta en el incremento o disminución del tamaño de la proteína nativa codificada por uno o unos pocos (por ejemplo, 2, 3, o 4) aminoácidos mientras se mantiene al menos una actividad de la proteína nativa codificada por el polinucleótido.

Los oligonucleótidos como se describen en la presente memoria pueden ser ARN, ADN, o derivados de uno de éstos. El tamaño mínimo de dichos oligonucleótidos es el tamaño requerido para la formación de un híbrido estable entre un oligonucleótido y una secuencia complementaria en una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos, más preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 19 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 25 nucleótidos. La presente especificación incluye oligonucleótidos que pueden usarse, por ejemplo, como sondas para identificar moléculas de ácido nucleico, o cebadores para producir moléculas de ácido nucleico. Los oligonucleótidos como se describen en la presente memoria usados como una sonda se conjugan normalmente con un marcador tal como un radioisótopo, una enzima, biotina, una molécula fluorescente o una molécula quimioluminiscente.

Los polinucleótidos y oligonucleótidos como se describen en la presente memoria incluyen aquellos que hibridan en condiciones astringentes con una secuencia proporcionada como SEQ ID NO's: 5 a 13. Tal y como se usan en la presente memoria, condiciones astringentes son aquellas que (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo, 0,015 M NaCl/0,0015 M citrato de sodio/0,1 % NaDodSO₄ a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturante tal como formamida, por ejemplo, 50 % (vol/vol) formamida con 0,1 % albúmina de suero bovino, 0,1 % Ficoll, 0,1 % polivinilpirrolidona, 50 mM tampón fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM NaCl, 75 mM citrato de sodio a 42 °C; o (3) emplean 50 % formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1 % pirofosfato de sodio, solución 5 x Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 g/ml), 0,1 % SDS y 10 % sulfato de dextrano a 42 °C en 0,2 x SSC y 0,1 % SDS.

Los polinucleótidos como se describen en la presente memoria pueden poseer, cuando se comparan con moléculas naturales, una o más mutaciones que son deleciones, inserciones, o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los mutantes pueden ser naturales (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, realizando mutagénesis dirigida a sitio en el ácido nucleico).

También se describen ácidos nucleicos antisentido y/o catalíticos (tales como ribozimas) que hibridan con un polinucleótido descrito en la presente memoria, y por lo tanto inhiben la producción de una proteína codificada. Además, se describen moléculas de ARNs, particularmente moléculas de ARNs pequeñas con una región bicatenaria de aproximadamente 21 nucleótidos, que puede usarse en interferencia de ARN para inhibir la producción de un polipéptido de la invención en una célula. Dichas moléculas inhibitoras pueden usarse para alterar los tipos de ácidos grasos producidos por una célula, tal como una célula animal, musgo, o célula de alga. La producción de dichos ácidos nucleicos antisentido, catalíticos y moléculas de ARNs está dentro de la capacidad del experto en la técnica (véase, por ejemplo, G. Hartmann y S. Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999); Haseloff y Gerlach, 1988; Perriman et al., 1992; Shippy et al., 1999; Waterhouse et al. (1998); Smith et al. (2000); WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, y WO 01/34815).

Construcciones génicas y vectores

Una realización descrita en la presente memoria incluye un vector recombinante, que incluye al menos una molécula de polinucleótido aislada que codifica un polipéptido/enzima definido en la presente memoria, insertada en cualquier vector capaz de administrar la molécula de ácido nucleico en una célula huésped. Dicho vector contiene secuencias de ácido nucleico heterólogas, esto es secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente adyacentes a las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria y que se obtienen preferiblemente de una especie distinta de la especie de la que se obtienen la o las moléculas de ácido nucleico. El vector puede ser ARN o ADN, bien procariota o eucariota, y normalmente es un virus o un plásmido.

Un tipo de vector recombinante comprende una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria unida de manera operativa a un vector de expresión. Como se ha indicado anteriormente, la expresión unida de manera operativa se refiere a la inserción de una molécula de ácido nucleico en un vector de expresión de una manera tal que la molécula es capaz de expresarse cuando se transforma en una célula huésped. Tal y como se usa en la presente memoria, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN que es capaz de transformar una célula huésped y efectuar la expresión de una molécula de ácido nucleico especificada. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse en la célula huésped. Los vectores de expresión pueden ser bien procariotas o eucariotas, y son normalmente virus o plásmidos. Los vectores de expresión descritos en la presente memoria incluyen cualesquiera vectores que funcionan (es decir, dirigen la expresión génica) en células de planta recombinantes de la presente invención. Los vectores de expresión preferidos pueden dirigir la expresión génica en células de plantas.

En particular, los vectores de expresión como se describe en la presente memoria contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencia 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 ácido nucleico descritas en la presente memoria. En particular, las moléculas recombinantes descritas en la presente memoria incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, elongación, y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tal 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 recombinantes de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen varias de dichas secuencias de control de la transcripción.

Otra realización de la presente invención incluye una célula vegetal recombinante que comprende una célula huésped transformada con una o más moléculas recombinantes como se describe en la presente memoria. La transformación de una molécula de ácido nucleico en una célula puede conseguirse por cualquier método por el que una molécula de ácido nucleico puede insertarse en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero no están limitadas a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o puede crecerse en un tejido, órgano o un organismo multicelular. Las moléculas de ácido nucleico transformadas pueden permanecer extracromosómicamente o pueden integrarse en uno o más sitios en un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de tal manera que se retiene su capacidad de ser expresadas.

Plantas transgénicas y partes de las mismas

El término "planta" tal y como se usa en la presente memoria como un nombre se refiere a plantas completas, pero usado como un adjetivo se refiere a cualquier sustancia que está presente en, se obtiene de, deriva de, o está relacionada con una planta, tal como por ejemplo, órganos de planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, flores), células únicas (por ejemplo, polen), semillas, células de planta y semejantes. Las plantas proporcionadas por o contempladas para uso en la práctica de la presente invención incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En realizaciones preferidas, las plantas de la presente invención son plantas cultivadas (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, o guisante), u otras legumbres. Las plantas pueden crecerse 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*), cacahuets (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Lopmoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Anana comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia senensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), ficus (*Ficus casica*), guava (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendro (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avenas, o cebada.

En una realización, la planta es una planta oleaginosa, preferiblemente una planta cultivada oleaginosa. Tal y como se usa en la presente memoria, una "planta oleaginosa" es una especie de planta usada para 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 (linaza) o remolacha azucarera. Además, la planta oleaginosa puede ser otra *Brassicas*, algodón, cacahuete, amapola, mostaza, ricino, sésamo, alazor, o plantas que producen nueces. La planta puede producir altos niveles de aceite en su fruto, tal como olivo, aceite de palma o coco. Las plantas hortícolas a las que puede aplicarse la presente invención son lechuga, endivia, o crucíferas vegetales incluyendo col, brécol, o coliflor. La presente invención puede aplicarse en tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, tomate, o pimienta.

Cuando se desea la producción de ω 3 LC-PUFA es preferible que la especie de planta que se va a transformar tenga una proporción endógena de ALA a LA que es al menos 1:1, más preferiblemente al menos 2:1. Los ejemplos

incluyen la mayor parte, si no todas, de las semillas oleaginosas tal como linaza. Esto maximiza la cantidad de sustrato ALA disponible para la producción de SDA, ETA, ETrA, EPA, DPA y DHA.

5 Las plantas producidas usando los métodos de la invención pueden ser ya transgénicas, y/o transformadas con genes adicionales a los descritos con detalle en la presente memoria. En una realización, las plantas transgénicas de la invención también producen un $\omega 3$ desaturasa recombinante. La presencia de una $\omega 3$ desaturasa recombinante incrementa la proporción de ALA a LA en las plantas lo que, como se ha indicado en el párrafo anterior, maximiza la producción de LC-PUFA tal como SDA, ETA, ETrA, EPA, DPA y DHA.

10 Las plantas de grano que proporcionan semillas de interés incluyen plantas oleaginosas y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de grano, tal como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etc. Las plantas leguminosas incluyen judías y guisantes. Las judías incluyen goma de guar, garrofin, fenogreco, soja, alubias, caupí, soja verde, alubia lima, haba, lentejas, garbanzo, etc.

15 El término "extracto o parte de ésta" se refiere a cualquier parte de la planta. "Parte" se refiere generalmente a un tejido u órgano específico tal como una semilla o raíz, mientras un "extracto" implica normalmente la disrupción de las paredes celulares y posiblemente la purificación parcial del material resultante. Naturalmente, el "extracto o parte de ésta" comprenderá al menos un LC-PUFA. Los extractos pueden prepararse usando técnicas estándar de la técnica.

20 Las plantas transgénicas, como se definen en el contexto de la presente invención, incluyen plantas y su progenie que se han modificado genéticamente usando técnicas recombinantes. Esto sería generalmente para causar o aumentar la producción de al menos una proteína/enzima definida en la presente memoria en la planta u órgano de la planta deseado. Las partes de planta transgénicas incluyen todas las partes y células de dichas plantas tal como, por ejemplo, tejidos cultivados, callos, protoplastos. Las plantas transformadas contienen material genético que no contenían antes de la transformación. El material genético preferiblemente se integra de manera estable en el genoma de la planta. El material genético introducido puede comprender secuencias que aparecen naturalmente en la misma especie pero en un orden reorganizado o en una organización diferente de elementos, por ejemplo una secuencia antisentido. Dichas plantas están incluidas en la presente memoria en "plantas transgénicas". Una "planta no transgénica" es una que no se ha modificado genéticamente con la introducción de material genético por técnicas de ADN recombinante. En una realización preferida, las plantas transgénicas son homocigotas para cada uno y todos los genes que se han introducido (transgén) de manera que su progenie no se segrega para el fenotipo deseado.

35 Existen varias técnicas para introducir material genético extraño en una célula vegetal. Dichas técnicas incluyen aceleración del material genético recubierto en micropartículas directamente en las células (véase, por ejemplo, US 4.945.050 y US 5.141.131). Las plantas pueden transformarse usando tecnología de *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, US 5.177.010, US 5.104.310, US 5.004.863, US 5.159.135). La tecnología de electroporación también se ha usado para transformar plantas (véase, por ejemplo, WO 87/06614, US 5.472.869, 5.384.253, WO 92/09696 y WO 93/21335). Además de las numerosas tecnologías para transformar plantas, también puede variar el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños. Dicho tejido incluirá pero no estará limitado a tejido embrionario, tejido de callo de tipo I y II, hipocotilo, meristemo, y semejantes. Casi todos los tejidos de planta pueden transformarse durante el desarrollo y/o diferenciación usando técnicas apropiadas descritas en la presente memoria.

45 Se han descrito varios vectores adecuados para la transfección estable de células de planta o para el establecimiento de plantas transgénicas, por ejemplo, en Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, sup. 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 de plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes de planta clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras en 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión de plantas también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada por el medioambiente o el desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

55 Los ejemplos de promotores de plantas incluyen, pero no están limitados a subunidad pequeña de ribulosa-1,6-bisfosfato carboxilasa, promotor de beta-conglicinina, promotor de faseolina, promotores de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS), promotores del gen biosintético de almidón, promotor de ADH, promotores de choque por calor y promotores específicos de tejido. Los promotores también pueden contener determinados elementos de secuencia potenciadores que pueden mejorar la eficiencia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen pero no están limitados a Adh-intrón 1 y Adh-intrón 6.

65 Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en todos los tipos de células y en todo momento (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejido son responsables de la expresión génica en tipos de células o tejidos específicos, tales como las hojas o semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napin, ACP, globulina y semejantes) y estos promotores también pueden usarse. Los promotores también pueden ser

activos durante un determinado estadio del desarrollo de la planta así como activo en tejidos y órganos de la planta. Los ejemplos de dichos promotores incluyen pero no están limitados a promotores específicos de polen, específicos de embrión, específicos de seda de maíz, específicos de fibra de algodón, específicos de raíz, específicos de endosperma de semilla y semejantes.

5 En una realización particularmente preferida, el promotor dirige la expresión en tejidos y órganos en los que tiene lugar la biosíntesis de lípido y aceite, particularmente en células de semilla tales como células de endospermo y células del embrión en desarrollo. Los promotores que son adecuados son el promotor de gen napin 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 promotores que dan lugar a la expresión específica de semilla en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y semejantes. Los promotores importantes que son adecuados son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores descritos en WO 99/16890 (promotores del gen de 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 descritos por Broun et al. (1998) y US 20030159173.

20 En determinadas circunstancias puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulos físicos (genes de choque por calor); luz (RUBP carboxilasa); hormona (Em); metabolitos; y estrés. Pueden usarse otros elementos de transcripción y traducción deseables que funcionan en plantas.

25 Además de promotores de plantas, pueden usarse promotores de varias fuentes eficientemente en células de planta para expresar genes extraños. Por ejemplo, pueden usarse los promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen viral, tal como el virus de mosaico de coliflor (35S y 19S) y semejantes.

30 Será evidente que las plantas transgénicas adaptadas para la producción de LC-PUFA como se describe en la presente memoria, en particular DHA, pueden comerse directamente o usarse como una fuente para la extracción de ácidos grasos esenciales, de los que DHA sería un constituyente.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, "germinación" se refiere a la emergencia de la punta de la raíz de la cubierta de la semilla después de imbibición. "Velocidad de germinación" se refiere al porcentaje de semillas en una población que han germinado en un periodo de tiempo, por ejemplo 7 o 10 días, después de la imbibición. Una población de semillas puede evaluarse diariamente durante varios días para determinar el porcentaje de germinación con el tiempo.

40 Respecto a las semillas de la presente invención, tal y como se usa en la presente memoria el término "velocidad de germinación que es sustancialmente la misma" significa que la velocidad de germinación de las semillas transgénicas es al menos 60 %, más preferiblemente al menos 80 %, e incluso más preferiblemente al menos 90 %, la de las semillas isogénicas no transgénicas. Las velocidades de germinación pueden calcularse usando técnicas conocidas en la técnica.

45 Respecto adicionalmente a las semillas de la presente invención, tal y como se usa en la presente memoria el término "esquema de tiempo de germinación de la semilla es sustancialmente el mismo" significa que el esquema de tiempo de germinación de las semillas transgénicas es al menos 60 %, más preferiblemente al menos 80 %, e incluso más preferiblemente al menos 90 %, el de las semillas isogénicas no transgénicas. El esquema de tiempo de germinación puede calcularse usando técnicas conocidas en la técnica.

50 Los presentes inventores han descubierto que al menos en algunas circunstancias la producción de LC-PUFA en células de planta recombinantes se aumenta cuando las células son homocigotas para el transgén. Como resultado, se prefiere que la célula vegetal recombinante, preferiblemente la planta transgénica, sea homocigota para al menos un gen de desaturasa y/o elongasa. En una realización, las células/planta son homocigotas para la $\Delta 6/\Delta 5$ desaturasa del pez cebra y/o la elongasa de *C. elegans*.

Productos alimenticios

60 La presente invención incluye composiciones que pueden usarse como productos alimenticios. Para los propósitos de la presente invención, "productos alimenticios" incluyen cualquier alimento o preparación para consumo humano o animal (incluyendo para consumo entérico y/o parenteral) que cuando se introduce en el cuerpo (a) sirven para nutrir o construir tejidos o suministran energía; y/o (b) mantienen, restauran o soportan un estado nutricional o función metabólica adecuada. Los productos alimenticios de la invención incluyen composiciones nutricionales para bebés y/o niños pequeños.

65 Los productos alimenticios de la invención comprenden, una célula de la invención, una planta de la invención, la

semilla de la invención, o una composición junto con un o unos vehículos adecuados. El término "vehículo" se usa en su sentido más amplio para englobar cualquier componente que puede tener o no valor nutricional. Como apreciará el experto en la técnica, el vehículo debe ser adecuado para uso (o usarse en una concentración suficientemente baja) en un producto alimenticio tal que no tenga efecto perjudicial en un organismo que consume el producto alimenticio.

El producto alimenticio de la presente invención comprende un aceite, un éster de ácido graso o un ácido graso producido directa o indirectamente por el uso de los métodos, células o plantas desvelados en el presente documento. La composición puede estar bien en forma sólida o líquida. Además, la composición puede incluir macronutrientes, vitaminas, y/o minerales comestibles en cantidades deseadas para un uso particular. Las cantidades de estos ingredientes variará dependiendo de si la composición se pretende para uso con individuos normales o para uso con individuos que tienen necesidades especiales, tales como individuos que padecen trastornos metabólicos y semejantes.

Los ejemplos de vehículos adecuados con valor nutricional incluyen, pero no están limitados a, macronutrientes tales como grasas, carbohidratos y proteínas comestibles. Los ejemplos de dichas grasas comestibles incluyen, pero no están limitadas a, aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de grosella negra, aceite de soja, y mono- y diglicéridos. Los ejemplos de dichos carbohidratos incluyen (pero no están limitados a): glucosa, lactosa comestible, y almidón hidrolizado. Además, los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la composición nutricional de la invención incluyen (pero no están limitadas a) proteínas de soja, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero de la leche, o los hidrolizados de estas proteínas.

Respecto a vitaminas y minerales, puede añadirse lo siguiente a las composiciones de productos alimenticios de la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo, y Vitaminas A, E, D, C, y el complejo B. También pueden añadirse otras de estas vitaminas y minerales.

Los componentes utilizados en las composiciones de productos alimenticios de la presente invención pueden ser de origen semi-purificado o purificado. Por semi-purificado o purificado se quiere decir un material que se ha preparado por purificación de un material natural o por síntesis *de novo*.

Una composición de productos alimenticios de la presente invención también puede añadirse a alimento incluso cuando no se requiere la suplementación de la dieta. Por ejemplo, la composición puede añadirse a alimento de cualquier tipo, incluyendo (pero no limitado a): margarina, mantequilla modificada, quesos, leche yogurt, chocolate, caramelos, aperitivos, aceites de ensalada, aceites de cocinar, grasas de cocina, carnes, pescado y bebidas.

Además, el LC-PUFA producido según la presente invención o las células huésped transformadas para contener y expresar los genes objeto también pueden usarse como suplementos de alimento para animales para alterar la composición de ácidos grasos de los tejidos o leche del animal a una más deseable para el consumo humano o animal. Los ejemplos de dichos animales incluyen ovejas, ganado, caballos y semejantes.

Además, los productos alimenticios de la invención pueden usarse en acuicultura para incrementar los niveles de LC-PUFA en peces para consumo humano o animal.

En mamíferos, la denominada ruta "Sprecher" convierte DPA en DHA por tres reacciones, independiente de una $\Delta 7$ elongasa, $\Delta 4$ desaturasa, y una etapa de beta-oxidación (Sprecher et al., 1995) (Figura 1). Así, en productos alimenticios para consumo por mamíferos, por ejemplo formulaciones para el consumo por niños humanos, puede ser solo necesario proporcionar DPA producido usando los métodos de la invención ya que el sujeto mamífero será capaz de cubrir sus necesidades nutricionales para DHA usando la ruta "Sprecher" para convertir DPA en DHA. Como resultado, en una realización de la presente invención, un producto alimenticio descrito en la presente memoria para consumo por mamíferos al menos comprende DPA, en el que al menos una reacción enzimática en la producción de DPA se realizó por una enzima recombinante en una célula.

Composiciones

La presente especificación también describe composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los ácidos grasos y/o los aceites resultantes producidos usando los métodos de la invención.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más del LC-PUFA y/o los aceites, en combinación con un vehículo, adyuvante o transportador estándar, muy conocido, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión tal como una emulsión agua/aceite. La composición puede estar bien en forma líquida o sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un comprimido, cápsula, líquido o polvo ingerible, inyectable, o pomada o crema tópica. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, y semejantes. Además de dichos diluyentes inertes, la

composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saporíferos y agentes perfumantes.

5 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden comprender agentes de suspensión tales como isostearil alcoholes etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, y goma de tragacanto o mezclas de estas sustancias.

10 Las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas pueden prepararse usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, LC-PUFA producido de acuerdo con la presente invención puede formarse en comprimidos con bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa, y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como goma arábica, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes tales como almidón de patata o ácido algínico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas pueden prepararse incorporando estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y el o los LC-PUFA relevantes.

15 Para administración intravenosa, el LC-PUFA producido de acuerdo con la presente invención o derivados del mismo pueden incorporarse en formulaciones comerciales.

20 Una dosificación típica de un ácido graso particular es de 0,1 mg a 20 g, tomados de una a cinco veces al día (hasta 100 g diariamente) y está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1, 2, 5, o 10 g diariamente (tomados en una o múltiples dosis). Como se conoce en la técnica, es deseable un mínimo de aproximadamente 300 mg/día de LC-PUFA. Sin embargo, se apreciará que cualquier cantidad de LC-PUFA será beneficiosa para el sujeto.

25 Las rutas posibles de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, entérica (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida puede administrarse oralmente o rectalmente. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propelentes fisiológicamente aceptables para formar un pulverizador o inhalante.

30 La dosificación de la composición que se va a administrar al paciente puede determinarla un experto en la técnica y depende de varios factores tales como el peso del paciente, edad del paciente, salud global del paciente, historial pasado del paciente, estado inmune del paciente, etc.

35 Además, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para propósitos cosméticos. Puede añadirse a composiciones cosméticas pre-existentes de manera que se forma una mezcla o puede usarse un LC-PUFA producido según la invención objeto como el único ingrediente "activo" en una composición cosmética.

40 Usos médicos, veterinarios, agrícolas y en acuicultura

La presente especificación también describe el tratamiento de varios trastornos por el uso de las composiciones farmacéuticas y/o de producto alimenticio descritas en la presente memoria. En particular, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar restenosis después de angioplastia. Además, los síntomas de inflamación, artritis reumatoide, asma y psoriasis también pueden tratarse con las composiciones (incluyendo productos alimenticios) de la invención. La evidencia también indica que LC-PUFA puede estar implicado en el metabolismo del calcio; así, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento o prevención de osteoporosis y de piedras renales o en el tracto urinario.

50 Además, las composiciones de la presente invención también pueden usarse en el tratamiento del cáncer. Se ha mostrado que las células malignas tienen composiciones alteradas de ácidos grasos. Se ha mostrado que la adición de ácidos grasos ralentiza su crecimiento, causa la muerte celular e incrementa su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. Además, las composiciones de la presente invención también pueden ser útiles para tratar la caquexia asociada con el cáncer.

55 Las composiciones de la presente invención también pueden usarse para tratar diabetes ya que se ha demostrado un metabolismo y composición alterados de ácidos grasos en animales diabéticos.

60 Además, las composiciones de la presente invención, que comprenden LC-PUFA producido bien directamente o indirectamente a través del uso de las células de la invención, también pueden usarse en el tratamiento de eccema y en la reducción de la presión sanguínea. Además, las composiciones de la presente invención pueden usarse para inhibir la agregación plaquetaria, para inducir vasodilatación, para reducir los niveles de colesterol, para inhibir la proliferación de tejido de músculo liso y fibroso en la pared de los vasos, para reducir o para prevenir la hemorragia gastrointestinal y otros efectos secundarios de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (US 4.666.701), para prevenir o para tratar endometriosis y síndrome premenstrual (US 4.758.592), y para tratar encefalomiелitis miálgica y fatiga crónica después de infecciones virales (US 5.116.871).

65

Los usos adicionales de las composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, uso en el tratamiento o prevención de arritmias cardíacas, angioplastia, SIDA, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, síndrome de alcohol fetal, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistrofia, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa o una enfermedad ocular, así como para el mantenimiento de la salud general.

Además, las composiciones farmacéuticas y nutricionales descritas anteriormente pueden utilizarse en conexión con animales (es decir, domésticos o no domésticos, incluyendo mamíferos, pájaros, reptiles, lagartos, etc.), así como seres humanos, ya que los animales experimentan muchas de las mismas necesidades y afecciones de los seres humanos. Por ejemplo, el aceite o ácidos grasos de la presente invención pueden utilizarse en suplementos de alimentos de animales, sustitutos de alimentos de animales, vitaminas para animales o en pomadas tópicas para animales.

Las composiciones tales como productos alimenticios de la invención también pueden usarse en acuicultura para incrementar los niveles de LC-PUFA en peces para consumo humano o animal.

Cualquier cantidad de LC-PUFA será beneficiosa para el sujeto. Sin embargo, se prefiere que se administre al sujeto una "cantidad efectiva para tratar" la afección de interés. Dichas dosificaciones para tratar efectivamente una afección que se beneficiaría de la administración de un LC-PUFA son conocidas para los expertos en la técnica. Como un ejemplo, una dosis de al menos 300 mg/día de LC-PUFA durante al menos unas pocas semanas, más preferiblemente más tiempo sería adecuada en muchas circunstancias.

Anticuerpos

La especificación también describe anticuerpos monoclonales y/o policlonales que se unen específicamente al menos a un polipéptido descrito en la presente memoria o un fragmento de éste. Así, la presente especificación describe además un proceso para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales frente a estos polipéptidos.

El término "se une específicamente" se refiere a la capacidad del anticuerpo de unirse al menos a una proteína descrita en la presente memoria pero no a otras proteínas presentes en una célula recombinante, particularmente una célula vegetal recombinante, de la invención.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a una región de una proteína a la que se une el anticuerpo. Un epítipo puede administrarse a un animal para generar anticuerpos frente al epítipo, sin embargo, los anticuerpos descritos en la presente memoria preferiblemente se unen específicamente a la región del epítipo en el contexto de la proteína completa.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico. El suero del animal inmunizado se recoge y trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales contiene anticuerpos frente a otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antiseros policlonales son conocidas en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a polipéptidos también pueden ser producidos fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales por hibridomas es muy conocida. Pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus de Epstein-Barr. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos pueden cribarse para varias propiedades; es decir, para isotipo y afinidad de epítipo.

Una técnica alternativa implica el cribado de bibliotecas de exposición en fago en la que, por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv en la superficie de su cubierta con una gran variedad de regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Esta técnica es muy conocida en la técnica.

Para los propósitos de esta divulgación, el término "anticuerpo", a no ser que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión para un antígeno diana. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena única (scFv). Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo, como se describe en EP-A-239400.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden unirse a un soporte sólido y/o empaquetarse en kits en un contenedor adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones adecuados y semejantes.

Preferiblemente, los anticuerpos descritos en la presente memoria se marcan de manera detectable. Los marcajes detectables a modo de ejemplo que permiten la medida directa de la unión del anticuerpo incluyen radiomarcadores,

fluoróforos, agentes de tinción, lechos magnéticos, agentes quimioluminiscentes, partículas coloidales, y semejantes. Los ejemplos de marcadores que permiten la medida indirecta de la unión incluyen enzimas en el que el sustrato puede proporcionar un producto coloreado o fluorescente. Los marcadores detectables a modo de ejemplo adicionales incluyen enzimas unidas covalentemente capaces de proporcionar una señal de producto detectable después de la adición del sustrato adecuado. Los ejemplos de enzimas adecuadas para uso en conjugados incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y semejantes. Cuando no están disponibles comercialmente, dichos conjugados anticuerpo-enzima se producen fácilmente por técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Los marcadores detectables a modo de ejemplo adicionales incluyen biotina, que se une con alta afinidad a avidina o estreptavidina; fluorocromos (por ejemplo, ficobiliproteínas, ficoeritrina y aloficocianinas; fluoresceína y rojo Texas), que pueden usarse con un separador celular activado por fluorescencia; haptenos; y semejantes. Preferiblemente, el marcador detectable permite la medida directa en un luminómetro de placa, por ejemplo, biotina. Dichos anticuerpos marcados pueden usarse en técnicas conocidas en la técnica para detectar proteínas descritas en la presente memoria.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Cultivo de *Pavlova salina*

Los aislados de *Pavlova salina* incluyendo la cepa CS-49 de CSIRO Collection of Living Microalgae se cultivaron en condiciones de cultivo estándar (<http://www.marine.csiro.au/microalgae>). Un cultivo madre de la Colección se subcultivó y se aumentó de escala en una dilución de 1 en 10 durante transferencias consecutivas en matraces Erlenmeyer de 1 L en 10 L de bidones de policarbonato. El medio de cultivo fue f/2, una modificación del medio f de Guillard y Ryther (1962) que contenía nutrientes con mitad de contenido, con una temperatura de crecimiento de 20 ± 1 °C. Otras condiciones de cultivo incluyeron una intensidad de luz de 100 $\mu\text{moles. fotones PAR.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad, y burbujeo con 1 % CO_2 en aire a una velocidad de 200 $\text{mL.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Cultivo de levaduras y alimentación con ácidos grasos precursores

Se introdujeron plásmidos en levaduras por choque de calor y los transformantes se seleccionaron en placas con medio mínimo de levadura (YMM) que contenían 2 % rafinosa como la única fuente de carbono. Se establecieron cultivos de inóculo clonales en YMM líquido con 2 % rafinosa como la única fuente de carbono. Los cultivos experimentales se inocularon a partir de éstos, en YMM + 1 % NP-40, hasta una DO_{600} inicial de $\sim 0,3$. Los cultivos se crecieron a 30 °C con agitación (~ 60 rpm) hasta que la DO_{600} fue aproximadamente 1,0. En este punto se añadió galactosa hasta una concentración final de 2 % y se añadieron ácidos grasos precursores a una concentración final de 0,5mM. Los cultivos se incubaron a 20 °C con agitación durante 48 horas más antes de recoger por centrifugación. Los sedimentos celulares se lavaron con 1 % NP-40, 0,5 % NP-40 y agua para eliminar todos los ácidos grasos no incorporados de la superficie de las células.

Análisis por cromatografía de gases (GC) de ácidos grasos

Preparación de los ácidos grasos

Se formaron ésteres metilo de ácido graso (FAME) por transesterificación del sedimento de levadura centrifugado o semillas de *Arabidopsis* calentando con $\text{MeOH-CHCl}_3\text{-HCl}$ (10:1:1, v/v/v) a 90-100 °C durante 2 h en un tubo de ensayo de vidrio equipado con una tapa de rosca revestida con Teflón. Se extrajeron los FAME en hexano-diclorometano (4:1, v/v) y se analizaron por GC y GC-MS.

Cromatografía capilar gas-líquido (GC)

Se analizaron los FAME con cromatógrafo de gas Hewlett Packard (HP) 5890 GC o Agilent 6890 equipado con inyectores automáticos en serie HP 7673A o 6980 respectivamente y un detector de ionización por llama (FID). Las temperaturas del inyector y detector fueron 290 °C y 310 °C respectivamente. Las muestras de FAME se inyectaron a 50 °C en una columna capilar de sílice fusionada con metil silicona entrecruzada no polar (HP-5; 50 m x 0,32 mm d.i.; 0,17 μm de espesor de película.). Después de 1 min, la temperatura del horno se elevó hasta 210 °C a 30 °C min^{-1} , después hasta una temperatura final de 280 °C a 3 °C min^{-1} donde se mantuvo durante 5 min. El helio fue el gas vehicular con una presión en la cabeza de la columna de 65 KPa y la purga abierta 2 min después de la inyección. La identificación de los picos se basó en la comparación de los datos de tiempo de retención relativo con FAME estándar con confirmación usando espectrometría de masas. Para la cuantificación se usó software Empower (Waters) o Chemstation (Agilent) para integrar las áreas de los picos.

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

GC-MS se llevó a cabo en una trampa de iones Finnigan GCQ Plus GC-MS equipada con inyección en columna ajustada a 4 °C. Las muestras se inyectaron usando un auto muestreador AS2000 en un hueco de retención unido a

una columna de fase ligada HP-5 Ultra 2 (50 m x 0,32 mm d.i. x 0,17 µm espesor de la película). La temperatura inicial de 45 °C se mantuvo durante 1 min, seguido de programa de temperatura a 30 °C.min⁻¹ hasta 140 °C, después a 3 °C.min⁻¹ hasta 310 °C donde se mantuvo durante 12 min. Se usó helio como el gas vehicular. Las condiciones de operación del espectrómetro de masas fueron: energía de impacto de electrones 70 eV; corriente de emisión 250 µamp, línea de transferencia 310 °C; temperatura de la fuente 240 °C; velocidad de escaneo 0,8 escaneos.s⁻¹ e intervalo de masa 40-650 Dalton. Los espectros de masas se adquirieron y procesaron con software Xcalibur™.

Construcción de la biblioteca de ADNc de *P. salina*

El ARNm, para la construcción de una biblioteca de ADNc, se aisló de células de *P. salina* usando el método siguiente. Se convirtieron en polvo 2 g (peso húmedo) de células de *P. salina* usando un mortero y pilón en nitrógeno líquido y se esparció lentamente en un vaso de precipitados que contenía 22 ml de tampón de extracción que se agitaba constantemente. A esto, se añadieron 5 % polivinilpirrolidona insoluble, 90mM 2-mercaptoetanol, y 10mM ditioteitol y la mezcla se agitó durante 10 minutos más antes de ser transferida a un tubo Corex™. Se añadieron 18,4 ml de 3M acetato de amonio y se mezcló bien. La muestra se centrifugó a 6.000xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el ácido nucleico se precipitó por la adición de 0,1 volumen de 3M NaAc (pH 5,2) y 0,5 volúmenes de isopropanol frío. Después de 1 hora de incubación a -20 °C, la muestra se centrifugó a 6.000xg durante 30 minutos en un rotor oscilante. El sedimento se resuspendió en 1 ml de agua y se extrajo con fenol/cloroformo. La capa acuosa se transfirió a un tubo nuevo y los ácidos nucleicos se precipitaron otra vez por la adición de 0,1 volumen 3M NaAc (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol enfriado en hielo. El sedimento se resuspendió en agua, se determinó la concentración de ácido nucleico y el ARNm se aisló usando el sistema Oligotex mRNA (Qiagen).

Se sintetizó ADNc de primera cadena usando un cebador oligo-dT suministrado por el kit de síntesis ZAP-cDNA (Stratagene - cat # 200400) y la transcriptasa inversa SuperscriptIII (Invitrogen). El ADNc de doble cadena se ligó a adaptadores *EcoRI/XhoI* y a partir de esto se construyó una biblioteca usando el kit de síntesis ZAP-cDNA como se describe en el manual de instrucciones adjunto (Stratagene - cat # 200400). La titulación de la biblioteca primaria fue 2,5 x 10⁵ unidades formadoras de placa (pfu)/ ml y la de la biblioteca amplificada fue 2,5 x 10⁹ pfu/ ml. El tamaño medio del inserto de ADNc en la biblioteca fue 1,3 kilobases y el porcentaje de recombinantes en la biblioteca fue 74 %.

Ejemplo 2. Microalgas y contenidos de ácido graso poliinsaturado de las mismas

Colección CSIRO de microalgas vivas

CSIRO estableció y mantuvo una Colección de Microalgas Vivas (CLM) que contiene más de 800 cepas de 140 géneros que representan la mayor parte de las clases de microalgas marinas y algunas de agua dulce (lista de cepas con descarga disponible en <http://www.marine.csiro.au>). También se mantuvieron cepas micro-heterotróficas seleccionadas.

Esta colección es la colección de cultivo de microalgas mayor y más diversa en Australia. El CLM se centró en aislados de aguas australianas - más del 80 % de las cepas se aislaron de diversas localidades y zonas climáticas, del norte de Australia tropical hasta el Territorio Antártico Australiano, de medioambientes oceánicos, costeros, de estuario, intermarea y de agua dulce. Además, se ha puesto énfasis en la representación de diferentes poblaciones de una única especie, habitualmente por más de una cepa. Todas las cepas en la colección de cultivo fueron unialgal y la mayor parte fueron clonales. Un subconjunto de cepas fue axénico. Otra colección es la Colección NIES (National Institute for Environmental Studies, Environment Agency) mantenida en Japón.

Se sabe que las microalgas son cosmopolitas a nivel de especie morfológico, habiéndose mostrado una endemicidad muy baja. Sin embargo, este cosmopolitanismo morfológico puede ocultar una plétora de diversidad a nivel intra-específico. Ha habido varios estudios de diversidad genética en diferentes microalgas usando estrategias tales como inter cruzamiento, isozimas, velocidades de crecimiento y un rango de técnicas moleculares. La diversidad identificada por estos estudios varía de escalas regionales y globales amplias (Chinain et al., 1997) hasta entre y en las poblaciones (Gallagher, 1980; Medlin et al., 1996; Bolch et al., 1999a,b). La variación a nivel intra-específico, entre microalgas indistinguibles morfológicamente, habitualmente solo puede identificarse usando cepas aisladas del medioambiente y cultivadas en el laboratorio.

Es esencial tener genotipos identificables y estables en colecciones de cultivos. Aunque hay casos registrados de cambio o pérdida de características particulares en cultivos a largo plazo (Coleman, 1977), en general, el cultivo garantiza la continuidad y estabilidad genética de una cepa particular. Las estrategias de criopreservación también podrían usarse para limitar el potencial de deriva genética.

Microalgas y su uso en acuicultura

Debido a su composición química/nutricional incluyendo PUFA, las microalgas se utilizan en acuicultura como alimentos vivos para varios organismos marinos. Dichas microalgas deben tener un tamaño apropiado para la

5 ingestión y deben digerirse fácilmente. Deben tener velocidades de crecimiento rápidas, ser susceptibles de cultivo en masa, y también ser estables en cultivo frente a fluctuaciones en temperatura, luz y nutrientes como puede ocurrir en sistemas de criadero. Las cepas que cumplen con estos atributos y que se usan ampliamente en acuicultura incluyen cepas del hemisferio norte tales como *Isochrysis* sp. (T.ISO) CS-177, *Pavlova lutheri* CS-182, *Chaetoceros calcitrans* CS-178, *C. muelleri* CS-176, *Skeletonema costatum* CS-181, *Thalassiosira pseudonana* CS-173, *Tetraselmis suecica* CS-187 y *Nannochloropsis oculata* CS-189. Las cepas australianas usadas incluyen *Pavlova pinguis* CS-375, *Skeletonema* sp. CS-252, *Nannochloropsis* sp. CS-246, *Rhodomonas salina* CS-24 y *Navicula jeffreysi* CS-46. La evaluación bioquímica de más de 50 cepas de microalgas usadas (o con uso potencial) en acuicultura descubrió que las células crecidas hasta la fase de crecimiento logarítmica tardía contenían normalmente 10 a 40 % proteína, 10 a 20 % lípido y 5 a 15 % carbohidrato (Brown et al., 1997).

Composición de lípidos incluyendo contenido de PUFA de microalgas

15 Existe un interés considerable en microalgas que contienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) nutricionalmente importantes, en particular EPA [ácido eicosapentaenoico, 20:5(ω3)] y DHA [ácido docosahexaenoico, 22:6(ω3)] ya que éstos son esenciales para la salud tanto de los seres humanos como de animales en acuicultura. Aunque estos PUFA están disponibles de aceites de pescado, las microalgas son los productores primarios de EPA y DHA.

20 Se hizo un perfil de la composición de lípidos de un rango de microalgas (46 cepas) y particularmente la proporción y contenido de PUFA importantes en los lípidos de microalgas. La composición de PUFA C₁₈-C₂₂ de las cepas de microalgas de diferentes clases de algas varió considerablemente a lo largo del rango de clases de algas fototróficas (Tabla 3, Figura 2, véase también Dunstan et. al., 1994, Volkman et al., 1989; Mansour et al., 1999a). Las diatomeas y eustigmatofitos eran ricos en EPA y produjeron pequeñas cantidades del PUFA menos común, ARA [ácido araquidónico, 20:4(ω6)] con cantidades despreciables de DHA. Además, las diatomeas fabricaron C₁₆ PUFA inusuales tales como 16:4(ω1) y 16:3(ω4). Por el contrario, los dinoflagelados tuvieron concentraciones altas de DHA y proporciones moderadas a altas de EPA y PUFA C₁₈ precursor [18:5(ω3) y 18:4(ω3) SDA, ácido estearidónico]. Los primnesiofitos también contenían EPA y DHA, siendo EPA el PUFA dominante. Los criptomonadas fueron una fuente rica en el PUFA C₁₈ 18:3(ω3) (ALA ácido α-linolénico) y SDA, así como EPA y DHA. Las algas verdes (por ejemplo, Clorofitos tales como *Dunaliella* spp. y *Chlorella* spp.) fueron relativamente deficientes en ambos PUFA C₂₀ y C₂₂, aunque algunas especies tuvieron cantidades pequeñas de EPA (hasta 3 %) y normalmente contenían ALA y 18:2(ω6) abundantes, y también fueron capaces de fabricar 16:4(ω3). La significancia bioquímica y nutricional de PUFA C₁₆ no comunes [por ejemplo, 16:4(ω3), 16:4(ω1), 16:3(ω4)] y PUFA C₁₈ (por ejemplo, 18:5(ω3) y STA) no está clara. Sin embargo, existe un interés actual en PUFA C₁₈ tal como SDA que ahora se reconoce de manera creciente que son precursores de los EPA y DHA beneficiosos, a diferencia de ALA que solo tiene una conversión limitada a EPA y DHA.

40 Se aislaron nuevas cepas de traustocitridos australianos. Cuando se examinaron, estos traustocitridos mostraron una gran diversidad morfológica desde células únicas a agrupaciones de células, formas reticuladas complejas y estadios móviles. Los traustocitridos son un grupo de organismos de célula única que producen tanto un contenido alto de aceite como de LC-PUFA. Se pensó inicialmente que eran hongos primitivos, aunque más recientemente se les ha asignado la subclase Thraustochytridae (Chromista, Heterokonta), que les alinea más de cerca con otras algas heterokontes (por ejemplo, diatomeas y algas marrones). En cultivo, los traustocitridos pueden conseguir un rendimiento de biomasa considerablemente mayor (>20 g/L) que otras microalgas. Además, los traustocitridos pueden crecerse en fermentadores con una fuente de carbono orgánica y, por lo tanto, representan una fuente altamente atractiva, renovable y sin contaminantes de aceites omega-3.

TABLA 3. Distribución de PUFA y LC-PUFA seleccionados en microalgas y otros grupos, y áreas de aplicación.

Grupo	Género / Especie	PUFA	Aplicación
Eustigmatofitos	<i>Nannochloropsis</i>	EPA	Acuicultura
Diatomeas	<i>Chaetoceros</i>		
Dinoflagelados	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	DHA	Acuicultura, suplementos
Traustocitridos	<i>Schizochytrium</i>		de salud, fórmula infantil
Algas rojas	<i>Phorphyridium</i>	ARA	Acuicultura, fórmula infantil
Traustocitridos	especie no descrita		Industria farmacéutica
Hongos	<i>Mortierella</i>		(precursor de prostaglandinas)
Algas verde azuladas	<i>Spirulina</i>	GLA	suplementos de salud

Abreviaturas: ácido γ-linolénico, GLA, 18:3ω6; 20:5ω3, ácido eicosapentaenoico, EPA, 20:5ω3; ácido docosahexaenoico, DHA, 22:6ω3; ácido araquidónico, ARA, 20:4ω6.

50 Los perfiles de ácidos grasos representativos para traustocitridos australianos seleccionados se muestran en la Tabla 4. La cepa O fue particularmente atractiva ya que contenía muy altos niveles de DHA (61 %). Otros PUFA estuvieron presentes a menos de 5 % cada uno. Los traustocitridos que contenían alto DHA también contenían

- frecuentemente altas proporciones de 22:5 ω 6, ácido docosapentaenoico (DPA), como se observó para las cepas A, C y H. DPA solo fue un componente menor en la cepa O en las condiciones de cultivo empleadas, haciendo que esta cepa sea particularmente interesante. La cepa A contenía tanto DHA (28 %) como EPA (16 %) como el LC-PUFA principal. Las cepas C y H se diferenciaron de las demás cepas estando también presente ARA (10-13 %) como un LC-PUFA principal. Varios de los demás LC-PUFA estaban presentes en los traustoquitridos incluyendo DPA(3) y 22:4 ω 6 y otros componentes.

TABLA 4. Composición de ácidos grasos (% del total) de cepas de traustoquitrido.

Ácido graso	Composición en porcentaje Cepa			
	A	C	H	O
16:0	18,0	16,4	13,5	22,1
20:4 ω 6 ARA		4,0	10,5	13,4 0,7
20:5 ω 3 EPA	15,8	7,7	5,2	4,1
22:5 ω 6 DPA(6)	16,6	9,3	12,7	3,4
22:6 ω 3 DHA	28,2	21,6	19,2	61,0

- Los aislados de microalgas y traustoquitrido en el CLM que pueden usarse para el aislamiento de genes implicados en la síntesis de LC-PUFA son de los géneros o especies como sigue:

Clase Bacillariophyceae (Diatomeas)

- Attheya septentrionalis*, *Aulacoseira* sp., *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilum*, *Chaetoceros* cf. *mitra*, *Chaetoceros* cf. *peruvianus*, *Chaetoceros* cf. *radians*, *Chaetoceros didymus*, *Chaetoceros difficile*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros simplex*, *Chaetoceros socialis*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros* cf. *minus*, *Chaetoceros* cf. *tenuissimus*, *Coscinodiscus wailesii*, otras *Coscinodiscus* spp., *Dactyliosolen fragilissimus*, *Detonula pumila*, *Ditylum brightwellii*, *Eucampia zodiacus*, *Extubocellulus spinifera*, *Lauderia annulata*, *Leptocylindrus danicus*, *Melosira moniliformis*, *Melosira* sp., *Minidiscus trioculatus*, *Minutocellus polymorphus*, *Odontella aurita*, *Odontella mobiliensis*, *Odontella regia*, *Odontella rhombus*, *Odontella* sp., *Papiliocellulus simplex*, *Planktosphaerium* sp., *Proboscia alata*, *Rhizosolenia imbricata*, *Rhizosolenia setigera*, *Rhizosolenia* sp., *Skeletonema costatum*, *Skeletonema pseudocostatum*, *Skeletonema* sp., *Skeletonema tropicum*, otras *Skeletonema* spp., *Stephanopyxis turris*, *Streptotheca* sp., *Streptotheca tamesis*, *Streptotheca* spp., *Striatella* sp., *Thalassiosira delicatula*, *Thalassiosira eccentrica*, *Thalassiosira mediterranea*, *Thalassiosira oceanica*, *Thalassiosira oestrupii*, *Thalassiosira profunda*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira rotula*, *Thalassiosira stellaris*, otras *Thalassiosira* spp., *Achnanthes* cf. *amoena*, *Amphiprora* cf. *alata*, *Amphiprora hyalina*, *Amphora* spp., *Asterionella glacialis*, *Asterionellopsis glacialis*, *Biddulphia* sp., *Cocconeis* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Delphineis* sp., *Diploneis* sp., *Entomoneis* sp., *Fallacia carpentariae*, *Grammatophora oceanica*, *Haslea ostrearia*, *Licmophora* sp., *Manguinea* sp., *Navicula* cf. *jeffreysi*, *Navicula* spp., otras *Navicula* spp., *Nitzschia* cf. *bilobata*, *Nitzschia* cf. *constricta*, *Nitzschia* cf. *cylindrus*, *Nitzschia* cf. *frustulum*, *Nitzschia* cf. *paleacea*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia fraudulenta*, *Nitzschia frustulum*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricomutum*, *Pleurosigma delicatulum*, otras *Pleurosigma* spp., *Pseudonitzschia australis*, *Pseudonitzschia delicatissima*, *Pseudonitzschia fraudulenta*, *Pseudonitzschia pseudodelicatissima*, *Pseudonitzschia pungens*, *Pseudonitzschia* sp., *Pseudostaurosira shiloi*, *Thalassionema nitzschioides*, o *Thalassiothrix heteromorpha*.

Clase Chrysophyceae

- Chrysolepidomonas* cf. *marina*, *Hibberdia* spp., *Ochromonas danica*, *Pelagococcus subviridis*, *Phaeoplaca* spp., *Synura shagnicola* u otras Chrysophyte spp.

Clase Cryptophyceae

- Chroomonas placoidea*, *Chroomonas* sp., *Geminigera cryophila*, *Hemiselmis simplex*, *Hemiselmis* sp., *Rhodomonas baltica*, *Rhodomonas maculata*, *Rhodomonas salina*, *Rhodomonas* sp. u otras Cryptomonad spp.

Clase Dinophyceae (Dinoflagelados)

- Alexandrium affine*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium margalefi*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium protogonyaulax*, *Alexandrium tamarense*, *Amphidinium carterae*, *Amphidinium* cf. *britannicum*, *Amphidinium klebsii*, *Amphidinium* sp., *Amphidinium steinii*, *Amylax tricantha*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Enciculifera* sp., *Fragilidium* spp., *Gambierdiscus toxicus*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium galathaneum*, *Gymnodinium galatheanum*, *Gymnodinium nolleri*, *Gymnodinium sanguineum*, u otras *Gymnodinium* spp., *Gyrodinium pulchellum*, u otras *Gyrodinium* spp., *Heterocapsa niei*, *Heterocapsa rotundata*, *Katodinium* cf. *rotundatum*, *Kryptoperidinium foliaceum*, *Peridinium balticum*, *Prorocentrum gracile*, *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum micans*, *Protoceratium*

reticulatum, *Pyrodinium bahamense*, *Scrippsiella* cf. *precaria*, u otras *Scrippsiella* spp. *Symbiodinium microadriaticum*, o *Woloszynskia* sp.

Clase Euglenophyceae

5 *Euglena gracilis*.

Clase Prasinophyceae

10 *Pycnococcus* sp., *Mantoniella squamata*, *Micromonas pusilla*, *Nephroselmis minuta*, *Nephroselmis pyriformes*, *Nephroselmis rotunda*, *Nephroselmis* spp., u otras *Prasinophyte* spp., *Pseudoscourfieldia marina*, *Pycnococcus provasolii*, *Pyramimonas cordata*, *Pyramimonas gelidicola*, *Pyramimonas grossii*, *Pyramimonas oltmansii*, *Pyramimonas propulsa*, otras *Pyramimonas* spp., *Tetraselmis antarctica*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis* sp., *Tetraselmis suecica*, u otras *Tetraselmis* spp.

Clase Prymnesiophyceae

20 *Chrysochromulina acantha*, *Chrysochromulina apheles*, *Chrysochromulina brevifilum*, *Chrysochromulina camella*, *Chrysochromulina hirta*, *Chrysochromulina kappa*, *Chrysochromulina minor*, *Chrysochromulina pienaar*, *Chrysochromulina simplex*, *Chrysochromulina* sp., *Chrysochromulina spinifera*, *Chrysochromulina strobilus*, y otras *Chrysophyte* spp., *Chrysotila lamellosa*, *Cricosphaera carterae*, *Crystalolithus hyalinus*, *Diacronema vlkianum*, *Dicrateria inomata*, *Dicrateria* sp., *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Imantonia rotunda*, y otras *Isochrysis* spp., *Ochrosphaera neapolitana*, *Pavlova* cf. *pinguis*, *Pavlova gyrans*, *Pavlova lutheri*, *Pavlova pinguis*, *Pavlova salina*, *Pavlova* sp., *Phaeocystis* cf. *pouchetii*, *Phaeocystis globosa*, *Phaeocystis pouchetii*, otras *Phaeocystis* spp., *Pleurochrysis aff. carterae*, *Prymnesium parvum*, *Prymnesium patelliferum*, otras *Prymnesium* spp., o *Pseudoisochrysis paradoxa*.

Clase Raphidophyceae

30 *Chattonella antiqua*, otras *Chattonella* spp., *Fibrocapsa japonica*, otras *Fibrocapsa* spp., *Heterosigma akashiwo*, *Heterosigma carterae*, u otras *Heterosigma* spp.

Clase Thraustochytridae

35 *Schizochytrium* spp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*, u otras *Thraustochytrium* spp.

Clase Eustigmatophytae como una fuente de genes para la producción de EPA:

40 *Eustigmatos vischeri*, *Monodus subterraneus*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Vischeria helvetica*, *Vischeria punctata*, *Chloridella neglecta*, *Chloridella simplex*, *Chlorobotrys regularis*, *Ellipsoidon parvum*, *Ellipsoidon solitare*, *Eustigmatos magnus*, *Eustigmatos polyphem*, *Goniochloris sculpta*, *Monodus subterraneus*, *Monodus unipapilla*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis granulata*, *Nannochloropsis limnetica*, *Pseudocharaciopsis ovalis*, *Pseudocharaciopsis texensis*, *Pseudostaurastrum limneticum*, o *Vischeria stellata*

Ejemplo 3. Aislamiento de $\Delta 5/6$ desaturasa de pez cebra y caracterización funcional en levaduras

45 Al igual que las microalgas, algunos otros organismos tienen la capacidad de sintetizar LC-PUFA a partir de precursores tales como ácido α -linolénico (18:3, ALA) (véase la Figura 1) y algunos de los genes responsables para dicha síntesis se han aislado (véase Sayanova y Napier, 2004). Los genes implicados en la biosíntesis de omega-3 C₂₀+PUFA se han clonado de varios organismos incluyendo algas, hongos, musgos, plantas, nematodos y mamíferos. Tomando como base la comprensión actual de los genes implicados en la síntesis de omega-3 C₂₀+PUFA, la síntesis de EPA en plantas requeriría la transferencia de genes que codifican al menos dos desaturasas y una PUFA elongasa. La síntesis de DHA a partir de EPA en plantas requeriría la transferencia adicional de una desaturasa más y una elongasa más (Sayanova y Napier, 2004). Estas enzimas son: para la síntesis de EPA, se requieren las actividades secuenciales de una $\Delta 6$ desaturasa, $\Delta 6$ elongasa y una $\Delta 5$ desaturasa. Tomando como base una ruta alternativa operativa en algunas algas, EPA también puede sintetizarse por las actividades secuenciales de una $\Delta 9$ elongasa, una $\Delta 8$ desaturasa y una $\Delta 5$ desaturasa (Wallis y Browse, 1999; Qi et al., 2002). Para la conversión adicional de EPA en DHA en plantas, se requerirá una transferencia adicional de una $\Delta 5$ elongasa y $\Delta 4$ desaturasa (Sayanova y Napier, 2004).

60 Hastings et al. (2001) aislaron un gen que codifica una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional de pez cebra (*Danio rerio*) y mostraron que, cuando se expresa en levaduras, la desaturasa fue capaz de catalizar la síntesis tanto de ácidos grasos $\Delta 6$ (GLA y SDA) como $\Delta 5$ (20:4 y EPA). La desaturasa fue por lo tanto capaz de actuar en ambos sustratos $\omega 6$ y $\omega 3$.

65 Aislamiento de la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra

Se extrajo ARN usando el sistema RNAeasy según las instrucciones de los fabricantes (Qiagen) a partir de hígados recién diseccionados de pez cebra. Tomando como base la secuencia publicada (Hastings et al. 2001), se diseñaron cebadores, con sentido, 5'-CCCAAGCTTACTATGGGTGGCGGAGGACAGC-3' (SEQ ID NO:39) y antisentido 5'-CCGCTGGAGTTATTGTTGAGATACGC-3' (SEQ ID NO:40) en los extremos 5' y 3' del $\Delta 5/6$ ORF de pez cebra y se usaron en una PCR de transcripción inversa en una etapa (RT-PCR, Promega) con el ARN extraído y usando condiciones de tampón como recomienda el fabricante. Se obtuvo un único amplicón con un tamaño de 1.335pb, se ligó en pGEM-T easy (Promega) y la secuencia se confirmó como idéntica a la publicada.

Se escindió un fragmento que contiene la región codificadora completa (SEQ ID NO:38) y se ligó en el vector lanzadera de levaduras pYES2 (Invitrogen). El vector pYES2 portaba el gen *URA3*, que permitió la selección para los transformantes de levadura tomando como base la prototrofia de uracilo. La región codificadora insertada estaba bajo el control del promotor inducible *GAL1* y señal de poliadenilación de pYES2. El plásmido resultante se designó pYES2-zf $\Delta 5/6$, para la introducción y expresión en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Expresión de $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra en levaduras

La construcción génica pYES2-zf $\Delta 5/6$ se introdujo en la cepa de levaduras S288. La levadura fue un buen huésped para analizar el potencial heterólogo de los genes de la biosíntesis de LC-PUFA incluyendo desaturasas y elongasas por varias razones. Se transformó fácilmente. No sintetizaba ningún LC-PUFA por sí misma y, por lo tanto, cualquier PUFA nuevo fabricado era fácilmente detectable sin problemas de fondo. Además, las células de levadura incorporaban fácilmente ácidos grasos del medio de crecimiento en lípidos celulares, permitiendo de esta manera la presentación de los precursores apropiados a las células transformadas que contenían los genes que codificaban las nuevas enzimas, permitiendo la confirmación de sus actividades enzimáticas.

Análisis bioquímicos

Las células de levadura transformadas con pYES2-zf $\Delta 5/6$ se crecieron en medio YMM y se indujeron por la adición de galactosa. Los ácidos grasos 18:3 $\omega 3$ (ALA, 0,5 mM) o 20:4 $\omega 3$ (ETA, 0,5 mM) se añadieron al medio como se ha descrito anteriormente. Después de 48 horas de incubación, las células se recogieron y los análisis de ácidos grasos se realizaron por cromatografía gas-líquida (GC) capilar como se describe en el Ejemplo 1. El análisis mostró que 18:4 $\omega 3$ (1,9 % de ácido graso total) se formó a partir de 18:3 $\omega 3$ y 20:5 $\omega 3$ (0,24 % de ácidos grasos) a partir de 20:4 $\omega 3$, demostrando actividad $\Delta 6$ desaturasa y actividad $\Delta 5$ desaturasa, respectivamente. Estos datos se resumen en la Tabla 5 y confirman los resultados de Hastings et al (2001).

Ejemplo 4. Aislamiento de elongasa de *C. elegans* y caracterización funcional en levaduras

Clonación del gen de elongasa de *C. elegans*

Beaudoin et al., aislaron un gen que codifica una elongasa de ácidos graso de tipo ELO del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al., 2000) y este gen se aisló como sigue. Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos que tenían las secuencias 5'-GCGGGTACCATGGCTCAGCATCCGCTC-3' (SEQ ID NO:41) (orientación con sentido) y 5'-GCGGGATCCTTAGTTGTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO:42) (orientación antisentido) y se sintetizaron, tomando como base los extremos 5' y 3' de la región codificadora de la elongasa. Estos cebadores se usaron en una reacción de PCR para amplificar la región codificadora de 867 pares de bases de una biblioteca de genes de estadio mixto de *C. elegans* N2, usando una temperatura de hibridación de 58 °C y un tiempo de extensión de 1 minuto. La amplificación por PCR se realizó durante 30 ciclos. El producto de la amplificación se insertó en el vector pGEM™ T-easy (Promega) y se confirmó la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:37). Un fragmento *EcoRI/BamHI* incluyendo la región codificadora completa se escindió e insertó en los sitios *EcoRI/BglIII* de pSEC-TRP (Stratagene), generando pSEC-Ceelo, para la introducción y expresión en levaduras. pSEC-TRP contiene el gen TRP1, que permitió la selección de transformantes en levaduras por prototrofia de triptófano, y el promotor GAL1 para la expresión del gen quimérico de una manera inducible en presencia de galactosa en el medio de crecimiento.

TABLA 5. Actividades enzimáticas en levaduras y *Arabidopsis*

Clon	PUFA Precursor	PUFA Sintetizado	% (de FA total)	Actividad observada
pYES2-zf $\Delta 5/6$	18:3 $\omega 3$	18:4 $\omega 3$	1,9	$\Delta 6$ desaturasa
pYES2-zf $\Delta 5/6$	20:4 $\omega 3$	20:5 $\omega 3$	0,24	$\Delta 5$ desaturasa
pYES2zf $\Delta 5/6$, pSEC-Ceelo	18:3 $\omega 3$	18:4 $\omega 3$	0,82	$\Delta 6$ desaturasa
		20:3 $\omega 3$	0,20	$\Delta 9$ elongasa
		20:4 $\omega 3$	0,02	$\Delta 6$ elongasa
				NO

ES 2 715 640 T3

pYES2-psΔ8	18:3ω3	18:4ω3	-	Δ6 desaturasa
pYES2-psΔ8	20:3ω3	20:4ω3	0,12	Δ8 desaturasa
pYES2-psELO1	18:2ω6	20:2ω6	-	
pYES2-psELO1	18:3ω3		-	
pYES2-psELO1	20:3ω3	22:3ω3	-	
pYES2-psELO1	20:4ω3	22:4ω3	-	
pYES2-psELO1	20:5ω3	22:5ω3	0,82	Δ5 elongasa
pYES-psELO2	18:2ω6	20:2ω6	0,12	Δ9 elongasa
pYES-psELO2	18:3ω3	20:3ω3	0,20	Δ9 elongasa
pYES-psELO2	20:3ω3	22:3ω3	-	
pYES-psELO2	20:4ω3	22:4ω3	-	
pYES-psELO2	20:5ω3	22:5ω3	-	
<i>Arabidopsis</i> + zfΔ5/6 y Ceelo (planta #1)	-	18:3ω6	0,32	Δ5/6 desaturasa, Δ5/6/9 elongasa
	-	18:4ω3	1,1	
	-	20:4ω6	1,1	
	-	20:5ω3	2,1	
	-	20:3ω6	1,1	
	-	20:4ω3	0,40	
	-	20:2ω6	3,2	
	-	20:3ω3	TR	
	-	22:4ω6	0,06	
	-	22:5ω3	0,13	
		22:3ω6	0,03	

TR, traza, no determinado con exactitud.

Caracterización funcional del gen de elongasa de *C. elegans* en levaduras

5 La cepa de levadura S288 se transformó, usando el método descrito en el Ejemplo 1, con ambos vectores pYES2-zfΔ5/6 y pSEC-Ceelo simultáneamente y se seleccionaron los dobles transformantes en medio YMM que carecía de triptófano y uracilo. Los transformantes crecieron bien tanto en medio mínimo como enriquecido, a diferencia de los transformantes de la cepa S288 que portaban pSEC-Ceelo solo, en ausencia de pYES2-zfΔ5/6, que crecieron muy poco. Los dobles transformantes se crecieron en medio YMM y se indujeron por la adición de galactosa. El ácido graso 18:3ω3 (ALA, 0,5 mM) se añadió al medio y, después de 48 horas de incubación, las células se recogieron y se realizó el análisis de los ácidos grasos por cromatografía capilar gas-líquida (GC) como se describe en el Ejemplo 1. El análisis mostró que se formaron 18:4ω3 (0,82 % de ácido graso total) y 20:3ω3 (0,20 %) a partir de 18:3ω3, y 20:4ω3 (0,02 % de ácidos grasos) a partir de cualquiera de éstos, demostrando la acción concertada de una actividad elongasa además de la actividad Δ6 desaturasa y actividad Δ5 desaturasa de la desaturasa de pez cebra (Tabla 5). La acción concertada de un gen de Δ5/6 desaturasa bifuncional y un gen de elongasa no se ha informado anteriormente. En particular, el uso de una enzima bifuncional, si muestra las mismas actividades en células de planta, reduciría el número de genes que sería necesario introducir y expresar. Esto tampoco se ha informado anteriormente.

Ejemplo 5. Expresión coordinada de ácido graso desaturasa y elongasa en plantas

Construcción genética para co-expresión de la Δ6/Δ5 desaturasa de pez cebra y elongasa de *C. elegans* en células de planta

25 Beaudoin et al., (2000) mostraron que la proteína Δ6 elongasa de *C. elegans*, cuando se expresa en levaduras, podría elongar los ácidos grasos C18 Δ6 desaturados GLA y SDA, es decir, que tenía actividad Δ6 elongasa en sustratos C18. También mostraron que la proteína no tiene actividad Δ5 elongasa en un sustrato C20 en levaduras. Ensayamos, por lo tanto, si esta elongasa sería capaz de elongar los ácidos grasos Δ6 desaturados GLA y SDA en semilla de *Arabidopsis*. Se ha mostrado que las semillas de *Arabidopsis thaliana* contienen ácidos grasos tanto

omega-6 (18:2, LA) como omega-3 (18:3, ALA) (Singh et al, 2001). La presencia de 18:3 en particular hace que la semilla de *Arabidopsis* sea un sistema excelente para estudiar la expresión de genes que podrían dar lugar a la síntesis de omega-3 C₂₀+PUFA como EPA y DHA.

5 El ensayo para la actividad elongasa en *Arabidopsis* requirió la expresión coordinada de una Δ6 desaturasa en la semilla para formar en primer lugar GLA o SDA. Elegimos expresar el gen de elongasa en conjunción con el gen de desaturasa de pez cebrá descrito anteriormente. No había informes previos de la expresión de los genes de la Δ6/A5 desaturasa de pez cebrá y la elongasa de *C. elegans* en células de plantas, bien individualmente o conjuntamente.

10 La co-expresión específica de semilla de los genes de Δ6/A5 desaturasa de pez cebrá y elongasa de *C. elegans* se consiguió poniendo los genes independientemente bajo el control de un fragmento promotor - 309 napin, designado Fp1 (Stalberg et al., 1993). Para la transformación de plantas, los genes se insertaron en el vector binario pWvec8 que comprendía un gen de resistencia a higromicina potenciado como marcador seleccionable (Wang et al., 1997). Para conseguir esto, la región codificadora de la elongasa de *C. elegans* del Ejemplo 4 se insertó como un fragmento de extremos romos entre el fragmento Fp1 y Nos 3' poliadenilación/terminador en el vector binario pWvec8, formando pCeloPWvec8. La región codificadora de Δ5/Δ6 desaturasa de pez cebrá del Ejemplo 3 se insertó inicialmente como un fragmento de extremos romos entre las secuencias Fp1 y Nos 3' terminadoras y este casete de expresión se ensambló entre los sitios de clonación *Hind*III y *Apal* del vector de clonación pBluescript (Stratagene). Posteriormente, el vector completo que contenía el casete de expresión de desaturasa se insertó en el sitio *Hind*III de pCeloPWvec8, formando pZebdesatCeloPWvec8. La construcción, mostrada esquemáticamente en la Figura 3, se introdujo en la cepa de *Agrobacterium* AGL1 (Valvekens et al., 1988) por electroporación antes de la transformación en *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia. La construcción también se designó la construcción "DO", y las plantas obtenidas por transformación con esta construcción se indicaron con el prefijo "DO".

25 Transformación de plantas y análisis

La transformación de plantas se realizó usando el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Las semillas (semillas T1) de las plantas tratadas (plantas T0) se plaquearon en medio selectivo de higromicina (20 mg/l) y las plantas transformadas se seleccionaron y transfirieron a tierra para establecer plantas T1. Se recuperó una planta resistente a higromicina de un primer cribado y se estableció en tierra. El experimento de transformación se repitió y se recuperaron 24 plantas transgénicas T1 más confirmadas y se establecieron en tierra. Se esperaba que la mayor parte de estas plantas T1 fueran heterocigotas para los transgenes introducidos.

35 Se recogieron semillas T2 de las 25 plantas transgénicas en la madurez y se analizaron para composición de ácidos grasos. Como se resume en la Tabla 6, las semillas de *Arabidopsis* (ecotipo Columbia) no transformada contenían cantidades significativas tanto de ω6 como ω3, precursores de ácidos grasos C18 LA y ALA pero no contenían ningún Δ6-desaturado C18 (18:3ω6 o 18:4ω3), ω6-desaturado C20 PUFA o ω3-desaturado C20 PUFA. Por el contrario, los ácidos grasos del aceite de las semillas de las plantas transformadas que comprenden las construcciones génicas de Δ5/Δ6 desaturasa de pez cebrá y elongasa de *C. elegans* contenían 18:3ω6, 18:4ω3 y una serie completa de ω6-

TABLA 6. Composición de ácidos grasos en semillas transgénicas (% de ácido graso total en aceite de semilla).

Número de planta	Ácido graso											
	de GLA 18:3ω6	SDA 18:4ω3	ARA 20:4ω6	EPA 20:5ω3	DGLA 20:3ω6	ETA 20:4ω3	EDA 20:2ω6	ETra 20:3ω3	22:4ω6	DPA 22:5ω3	22:3ω6	
Wt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DO1	0,32	1,10	1,10	2,10	1,10	0,40	3,20	TR	0,06	0,13	0,03	
DO2	0,20	0,70	0,60	1,20	0,80	0,40	1,60	-	0,10	TR	-	
DO3	0,20	0,50	0,40	0,80	0,60	0,30	1,90	-	TR	TR	-	
DO4	0,30	0,90	0,80	1,30	1,10	0,50	1,90	-	-	0,10	-	
DO5	0,10	0,50	0,20	0,40	0,40	-	0,30	-	TR	TR	-	
DO6	0,30	1,00	1,00	1,70	1,20	0,50	2,50	-	0,10	0,10	-	
DO7	0,10	0,40	0,40	0,70	0,70	0,30	1,60	-	TR	TR	-	
DO8	0,30	1,20	1,10	2,10	1,40	0,60	2,80	-	0,10	0,10	-	
DO9	0,30	1,30	0,90	2,20	1,30	0,60	3,10	-	0,10	0,10	-	
DO10	0,10	0,40	0,30	0,70	0,50	0,30	0,10	-	TR	TR	-	
DO11	0,30	1,00	1,40	2,30	1,50	0,60	3,20	-	0,10	0,20	-	
DO12	0,40	1,40	1,10	1,90	1,20	0,60	2,30	-	0,10	0,10	-	
DO13	0,20	0,60	0,60	0,90	0,80	0,40	0,40	-	TR	0,10	-	
DO14	0,30	1,00	0,70	1,70	1,10	0,60	2,50	-	TR	TR	-	

Ácido graso

Número de planta	de GLA 18:3 ω 6	SDA 18:4 ω 3	ARA 20:4 ω 6	EPA 20:5 ω 3	DGLA 20:3 ω 6	ETA 20:4 ω 3	EDA 20:2 ω 6	ETrA 20:3 ω 3	22:4 ω 6	DPA 22:5 ω 3	22:3 ω 6
DO15	0,30	1,30	1,00	2,30	1,50	0,60	2,60	-	0,10	0,10	-
DO17	0,20	0,40	0,40	0,70	0,70	0,30	1,80	-	TR	TR	-
DO18	0,20	0,60	0,50	0,90	0,80	0,40	1,70	-	TR	TR	-
DO19	0,20	0,40	0,40	0,80	0,70	0,30	2,00	-	TR	0,10	-
DO20	0,30	1,00	0,50	0,90	0,70	0,30	1,60	-	TR	TR	-
DO21	0,30	1,20	0,90	2,00	1,30	0,60	2,50	-	-	0,10	-
DO22	0,30	0,90	0,70	1,20	1,00	0,40	0,30	-	TR	TR	-
DO23	-	-	-	-	0,10	0,10	1,80	-	-	-	-
DO24	0,30	1,10	0,70	1,50	1,10	0,50	2,90	-	TR	0,10	-
DO25	0,10	0,50	0,30	0,70	0,50	0,20	1,60	-	TR	0,10	-

Wt = Arabidopsis sin transformar (Columbia). TR indica menos de 0,05 %. El guión (-) indica no detectado.

5 y ω 3-C20 PUFA. Ésto resultó de la acción secuencial de las enzimas desaturasa y elongasa en los precursores C18 respectivos. De forma lo más importante e inesperada, la semilla transgénica contenía ambos 20:5 ω 3 (EPA), alcanzando al menos 2,3 % del ácido graso total en el aceite de la semilla, y 22:5 ω 3 (DPA), alcanzando al menos 0,2 % de este omega-3 LC-PUFA en el ácido graso del aceite de la semilla. Los ácidos grasos C20 totales producidos en el aceite de la semilla transgénica alcanzaron al menos 9,0 %. Los ácidos grasos ω 3 totales producidos que fueron un producto de Δ 6 desaturación (es decir, aguas abajo de 18:3 ω 3 (ALA), calculado como la suma de los porcentajes para 18:4 ω 3 (SDA), 20:4 ω 3 (ETA), 20:5 ω 3 (EPA) y 22:5 ω 3 (DPA)) alcanzaron al menos 4,2 %. Estos niveles representan una eficiencia de conversión de ALA, que está presente en aceite de semilla de las plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre usadas para la transformación a un nivel de aproximadamente 13-15 %, en productos ω 3 a través de una etapa de Δ 6 desaturación de al menos 28 %. Dicho de otra manera, la proporción de productos ALA a ALA (productos:ALA) en el aceite de la semilla fue al menos 1:3,6. De manera significativa aquí, *Arabidopsis* tiene una cantidad relativamente baja de ALA en su aceite de semilla comparado con algunos cultivos oleaginosos comerciales.

15 Las líneas T2 descritas anteriormente incluyeron líneas que eran homocigotas para los transgenes así como heterocigotas. Para distinguir homocigotas y heterocigotas para líneas que expresan los transgenes a los niveles más altos, se establecieron plantas T2 a partir de la semilla T2 para las 5 líneas que contenían los niveles más altos de EPA, usando la selección en medio MS que contenía higromicina (15mg/L) para determinar la presencia de los transgenes. Por ejemplo, la semilla T2 se usó de la planta T1 designada DO11, que contenía 2,3 % EPA y mostrando una proporción de segregación 3:1 de progenie resistente a susceptible en el medio de higromicina, indicando que DO11 contenía los transgenes en un único locus genético. Se identificaron las líneas homocigotas. Por ejemplo, la progenie T2 de la planta DO11-5 era homocigota como se muestra por la resistencia uniforme a higromicina en su progenie T3. Otras plantas T2 fueron heterocigotas para el marcador higromicina.

25 Se analizaron los perfiles de ácidos grasos de lotes de semillas T3 de DO11-5 y otra progenie T2 de DO11 y los datos se presentan en la Tabla 7. Como se esperaba, los contenidos de EPA reflejaron segregación de la construcción DO. Los niveles de EPA en los ácidos grasos del aceite de semilla obtenido de las líneas T3 estaban en tres grupos: despreciable (nulo para la construcción DO), en el intervalo 1,6-2,3 % (heterocigotos para la construcción DO) y alcanzando al menos 3,1 % (homocigotos para la construcción DO). Los niveles obtenidos fueron mayores en homocigotos que en heterocigotos, indicando un efecto de dosificación génica. La semilla T3 de la planta DO11-5 sintetizó un total de 9,6 % nuevos ω 3 y ω 6 PUFA, incluyendo 3,2 % EPA, 1,6 % ARA, 0,1 % DPA, 0,6 % SDA y 1,8 % GLA (Tabla 7). Este nivel de síntesis de EPA en semilla fue cuatro veces mayor que el nivel de 0,8 % conseguido anteriormente en linaza

35

TABLA 7. Composición de ácidos grasos en semillas transgénicas (% de ácido graso total en aceite de semilla).

Ácido graso	Tipo silvestre	DO 11-5	DO 11-6	DO 11-7	DO 11-8	DO 11-10	DO 11-11	DO 11-12	DO 11-13	DO 11-16	DO 11-18	DO 11-19	DO 11-20	DO 11-21
14:0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
15:0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
16:1ω7	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	0,4	0,4	0,7	0,5
16:0	8,1	7,1	7,9	7,8	7,6	7,0	7,1	7,8	7,7	7,6	6,8	6,7	7,6	7,3
17:1ω8	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
17:0	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
18:3ω6														
18:4ω3														
18:2ω6	26,6	25,8	29,8	28,6	28,8	25,6	25,4	28,6	25,6	29,0	25,7	25,2	29,4	27,3
18:1ω9	17,9	18,7	15,6	19,6	18,2	22,0	18,6	18,6	20,4	15,5	20,1	19,8	16,6	14,8
18:1ω7/18:3ω3	16,0	11,5	15,3	14,7	15,9	10,6	11,6	14,5	11,1	16,0	13,7	13,6	14,8	13,1
18:0	3,4	4,2	2,9	2,7	2,8	3,5	3,9	2,8	3,9	2,9	3,3	3,4	2,9	3,7
19:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
20:4ω6	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,9	0,9	0,0	1,3	0,0	0,4	0,8	0,0	1,3
20:5ω3	0,0	3,2	0,0	0,1	0,0	1,6	2,1	0,0	2,1	0,0	1,1	1,8	0,0	2,3
20:3ω6	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	1,2	1,5	0,0	1,4	0,0	0,7	1,0	0,0	1,5
20:4ω3	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,2	0,0	0,3	0,4	0,0	0,5
20:2ω6	0,0	3,4	0,2	0,1	0,2	2,2	3,1	0,1	2,4	0,2	1,7	2,1	0,1	2,8
20:1ω9/ω11	17,4	10,9	17,8	18,1	17,3	14,8	12,5	18,2	13,2	18,0	15,4	14,0	18,6	12,4
20:1ω7	1,9	2,7	2,2	1,9	2,2	2,2	2,3	2,0	2,0	2,3	2,2	2,2	2,3	2,7
20:0	1,8	1,8	2,1	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	2,2	2,0	2,0	2,3	2,1
22:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
22:5ω3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2
22:1ω11/ω13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1ω9	1,3	0,8	1,9	1,7	1,7	1,5	1,1	1,7	1,1	2,0	1,6	1,4	2,1	1,5
22:1ω7	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
22:0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
24:1ω9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
24:1ω7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24:0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3

Tipo silvestre aquí se refiere a *Arabidopsis thaliana* sin transformar, ecotipo Columbia

(Abbadi et al., 2004). Considerando también que el nivel de precursor ALA para la síntesis de EPA en semilla de *Arabidopsis* fue menor de un tercio del presente en linaza, parecía que la ruta LC-PUFA como se ha descrito anteriormente que incluía una desaturasa que era capaz de usar un sustrato acil-CoA, estaba operando con una eficiencia significativamente mayor que la ruta desaturasa dependiente de acil-PC expresada en linaza.

Las eficiencias relativas de las etapas enzimáticas individuales codificadas por la construcción EPA pueden evaluarse examinando el porcentaje de conversión de ácidos grasos sustrato a ácidos grasos productos (incluyendo derivados posteriores) en DO11-5. La $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra presentó una fuerte $\Delta 5$ desaturación, con 89 % de 20:4 ω 3 siendo convertido a EPA y DPA, y 45 % de 20:3 ω 6 siendo convertido a ARA, consistente con la preferencia informada anteriormente de esta enzima para sustratos ω 3 PUFA sobre ω 6 PUFA (Hastings et al., 2001). En comparación, la $\Delta 6$ -desaturación ocurrió a niveles significativamente menores, con 32 % de ALA y 14 % de LA siendo convertidos a PUFA $\Delta 6$ -desaturado. Dado que estudios previos en levaduras mostraron que esta enzima tiene realmente una actividad $\Delta 6$ -desaturasa mayor que actividad $\Delta 5$ -desaturasa, los niveles menores conseguidos de $\Delta 6$ -desaturación en semillas de *Arabidopsis* podrían reflejar una disponibilidad limitada de sustratos ALA y LA en el combinado acil-CoA (Singh et al., en prensa). La $\Delta 6$ -elongasa operaba de una manera altamente eficiente, con 86 % de GLA y 67 % de SDA siendo elongados, lo que sugiere que esta enzima puede tener una ligera preferencia para elongación de sustrato ω 6-PUFA.

La capacidad de germinación de la semilla T2 (segregante) y T3 (población homocigota) se evaluó en medio MS y en tierra. La semilla de las líneas que contienen EPA y DPA DO11 y DO11-5 mostró el mismo esquema de tiempo y frecuencia de germinación que la semilla de tipo silvestre, y las plantas T2 y T3 no tienen ningunas características morfológicas anormales aparentes. Las velocidades de crecimiento de las plantas *in vitro* o en tierra y las cantidades de semilla obtenida de las plantas tampoco se vieron afectadas. Incluyendo la germinación de la semilla T1 de la que se obtuvo la planta DO11, la germinación normal de la semilla de la línea DO11 se observó así durante tres generaciones. Además, también se observaron velocidades normales de germinación y esquema de tiempo para las demás semillas que contenían EPA y DPA. Esta característica fue tanto importante como no predecible, ya que las plantas superiores no producen de forma natural EPA o DPA y su semilla por lo tanto no ha contenido nunca anteriormente estos LC-PUFA. La germinación requiere el catabolismo de aceites de la semilla almacenados y el uso para el crecimiento y como un suministro de energía. Las velocidades de germinación normales observadas mostraron que la semilla de la planta era capaz de llevar a cabo estos procesos usando EPA y DPA, y que estos compuestos no eran tóxicos.

Se ha informado que una $\Delta 4$ desaturasa codificada por un gen aislado de *Thraustochytrium spp* y expresado en hojas de *Brassica juncea* era capaz de convertir DPA suministrado exógenamente en DHA (Qiu et al., 2001). DPA producido en la semilla de la planta descrita en la presente memoria puede servir como un precursor para la producción de DHA. Esta conversión de DPA en DHA puede conseguirse en células de planta por la introducción de un gen de $\Delta 4$ desaturasa en las células de planta que producen DPA (Ejemplo 11).

Discusión

La presencia de 22:5 ω 3 en el aceite de semilla de *Arabidopsis* implicó que el gen de elongasa de *C. elegans* no solo tenía actividad $\Delta 6$ elongasa, sino también actividad $\Delta 5$ elongasa en células de planta. Este resultado fue muy sorprendente dado que se había demostrado que el gen carecía de actividad $\Delta 5$ elongasa en levadura. Además, esto demostró que solo dos genes podrían usarse para la síntesis de DPA a partir de ALA en células de planta. La síntesis de DPA en una planta superior no se ha informado anteriormente. Además, fue llamativa la eficiencia de la conversión de ALA en sus productos ω 3 en semilla, incluyendo EPA, DPA o ambos, de al menos 28 %.

La síntesis de LC-PUFA tal como EPA y DHA en células tales como células de planta por la ruta de $\Delta 6$ desaturación requirió la acción secuencial de PUFA desaturasas y elongasas. Las desaturasas requeridas en una ruta tenían actividad $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ desaturante, en ese orden, y las elongasas PUFA requeridas tenían actividad de elongación sobre sustratos $\Delta 6$ y $\Delta 5$. Esta ruta convencional opera en algas, musgos, hongos, diatomeas, nematodos y algunos peces de agua dulce (Sayanova y Napier, 2004). Las PUFA desaturasas de algas, hongos, musgos y gusanos son selectivas para la desaturación de ácidos grasos esterificados en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) mientras las PUFA elongasas actúan sobre ácidos grasos en la forma de sustratos acil-CoA representados en el combinado acil-CoA de tejidos. Por el contrario, se ha mostrado que las $\Delta 6$ desaturasas de vertebrados son capaces de desaturar sustratos acil-CoA (Domergue et al., 2003a).

Los intentos para reconstituir las rutas LC-PUFA en células de planta y otras células tienen que tener en cuenta los diferentes sitios de acción y requerimientos de sustrato de las enzimas desaturasas y elongasa. Por ejemplo, las PUFA elongasas están unidas a membrana, y quizá incluso proteínas integrales de membrana, que usan acil-CoA que están presentes como un combinado claro en el retículo endoplásmico (ER). Este combinado de acil-CoA está fisiológicamente separado del componente PC del ER, sin embargo para que un ácido graso PUFA sea desaturado y elongado secuencialmente tiene que transferirse entre combinados de PC y acil-CoA en el ER. Por lo tanto, los intentos de los que se ha informado anteriormente de constituir biosíntesis de LC-PUFA en levadura usando desaturasas y elongasa de plantas inferiores y superiores, hongos y gusanos, han sido, como mucho, ineficientes. Además, las rutas constituidas han dado lugar solo a la síntesis de C20 PUFA tales como ARA y EPA. No hay

ningún informe previo de la síntesis de C22 PUFA tales como DPA y DHA en levadura (Beaudoin et al., 2000, Domergue et al., 2003a).

La estrategia descrita anteriormente de usar una desaturasa de vertebrados, en este ejemplo una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra, con una $\Delta 6$ PUFA elongasa de *C. elegans* tenía la ventaja de que tanto la desaturasa como la elongasa tienen actividad en sustratos acil-CoA en el combinado acil-CoA. Esto puede explicar por qué esta estrategia fue más eficiente en la síntesis de LC-PUFA. Además, usando una desaturasa bifuncional que presenta actividades $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa duales permitió la síntesis de EPA por la acción de solo 2 genes en lugar de los 3 genes usados por los demás investigadores (Beaudoin et al., 2000, Domergue et al., 2003a). El uso de una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional en células de planta también permitió la formación de DPA a partir de ALA por la inserción de solo tres genes (una elongasa y dos desaturasas) o, como se ejemplifica, de solo dos genes (elongasa bifuncional y desaturasa bifuncional). Ambos de estos aspectos fueron sorprendentes e inesperados.

La evidencia bioquímica sugiere que la elongación de ácidos grasos consiste en 4 etapas: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. Hasta ahora se han identificado dos grupos de enzimas de condensación. El primero está implicado en la síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (C18-22). Éstos son las enzimas semejantes a FAE y no parece que tengan un papel en la biosíntesis de LC-PUFA. La otra clase de elongasas identificada pertenecen a la familia ELO de elongasas que se denominan como la familia de genes ELO cuyas actividades se requieren para la síntesis de los ácidos grasos de cadena muy larga de esfingolípidos en levaduras. Se ha mostrado que los parálogos aparentes de las elongasas de tipo ELO aislados de los organismos que sintetizan LC-PUFA como algas, musgos, hongos y nematodos están implicados en la elongación y síntesis de LC-PUFA. Se ha mostrado que solo se requiere la expresión del componente de condensación de la elongasa para la elongación de la cadena acilo respectiva. Así, el componente de condensación de la elongasa introducido es capaz de reclutar con éxito las actividades de reducción y deshidratación del huésped transgénico para llevar a cabo las elongaciones de acilo con éxito. Hasta ahora, se han demostrado elongaciones exitosas de PUFA C16 y C18 en levadura por la expresión heteróloga de elongasas de tipo ELO. A este respecto, la elongasa de *C. elegans* usada como se ha descrito anteriormente fue incapaz de elongar C20 PUFA cuando se expresó en levadura (Beaudoin et al., 2000). Nuestra demostración de que la elongasa de *C. elegans*, cuando se expresa en plantas, fue capaz de elongar el ácido graso C20:5 EPA como se pone de manifiesto por la producción de DPA en semilla de *Arabidopsis* fue un resultado nuevo e inesperado. Una explicación a por qué la elongasa de *C. elegans* fue capaz de elongar C20 PUFA en plantas, pero no en levadura, podría residir en su capacidad de interactuar con éxito con los demás componentes de la maquinaria de elongación de las plantas para unirse y actuar sobre sustratos C20.

Este ejemplo mostró que una elongasa de tipo ELO de un organismo no vertebrado fue capaz de elongar C20 PUFA en células de planta. Leonard et al. (2002) informaron que un gen de elongasa de tipo ELO aislado de seres humanos, cuando se expresó en levadura, fue capaz de elongar EPA a DPA pero de una manera no selectiva.

Ejemplo 6. Aislamiento de un gen de $\Delta 8$ desaturasa de *P. salina* y caracterización funcional en levadura

Las microalgas son los únicos organismos que se ha informado que contienen $\Delta 8$ desaturasas, además de las $\Delta 8$ desaturasas de esfingolípido en plantas superiores que no están implicadas en la biosíntesis de LC-PUFA. Un gen que codifica una $\Delta 8$ desaturasa se ha aislado de *Euglena gracilis* (Wallis y Browse, 1999). La existencia de una $\Delta 8$ desaturasa en *Isochrysis galbana* puede presumirse porque contiene una $\Delta 9$ elongasa (Qi et al., 2002), cuyo producto, 20:3n-3, es el precursor de una $\Delta 8$ desaturasa (véase la Figura 1). Los perfiles de ácido graso de microalgas solo, sin embargo, no proporcionan una base suficiente para identificar qué microalgas contendrán genes de $\Delta 8$ desaturasa ya que múltiples rutas pueden operar para producir el LC-PUFA.

Aislamiento de un fragmento de gen de $\Delta 8$ desaturasa

Un alineamiento de secuencias de aminoácidos de $\Delta 6$ desaturasa con las de los números de registro Genbank siguientes, AF465283, AF007561, AAC15586 identificó los bloques de secuencia de aminoácido consenso DHPGGS (SEQ ID NO:43), WWKDKHN (SEQ ID NO:44) y QIEHHLF (SEQ ID NO:45) correspondientes a las posiciones de aminoácidos 204-210 y 394-400, respectivamente, de AF465283. DHPGSS correspondió al bloque de "dominio citocromo b5" que se ha identificado anteriormente (Mitchell y Martin, 1995). WWKDKHN fue un bloque consenso que no se había identificado anteriormente o usado para diseñar cebadores degenerados para el aislamiento de genes desaturasa. El bloque QIEHHLF, o variantes de éste, correspondió a un resto que contenía histidina requerido que estaba conservado en desaturasas. Se había identificado y usado antes como la "tercera caja His" para diseñar oligonucleótidos degenerados para el aislamiento de genes desaturasa (Michaelson et al., 1998). Esta combinación de bloques no se había usado anteriormente para aislar genes desaturasa.

Tomando como base el segundo y tercer bloques de aminoácidos conservados, se sintetizaron los cebadores degenerados 5'-TGGTGAARCAAYAARCAAYAAY-3' (SEQ ID NO:46) y 5'-GCGAGGGATCCAAGGRAANARRTGRGTGYTC-3' (SEQ ID NO:47). El ADN genómico de *P. salina* se aisló usando el sistema DNAeasy (Qiagen). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 20 μ L usando 20 pmol de cada cebador, 200 ng de ADN genómico de *P. salina* y ADN polimerasa Hotstar Taq (Qiagen) con componentes de tampón y nucleótidos como se especifica. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 95 °C

durante 15 minutos; 5 ciclos de 95 °C 1min; 38 °C, 1min; 72 °C, 1min; seguido de 35 ciclos de 95 °C, 35 seg; 52 °C, 30 seg; 72 °C, 1min; y finalizando con 1 ciclo de 72 °C, 10min. Se generó un amplicón de 515 pares de bases, se ligó en pGEM-T easy (Promega), se secuenció y se usó como una sonda para cribar una biblioteca de ADNc de *P. salina*.

5

Aislamiento de un ADNc que codifica una $\Delta 8$ desaturasa de *P. salina*

Se construyó una biblioteca de ADNc de *P. salina* en bacteriófago λ usando el Kit de Síntesis Zap-cDNA (Stratagene) (véase el Ejemplo 1). La biblioteca se plaqueó a una concentración de ~50.000 placas por placa y se tomaron transferencias con membrana Hybond N+ y se trataron usando métodos estándar (Ausubel et al., 1988, *supra*). El fragmento de desaturasa de 515pb, generado por PCR, se radio-marcó con ^{32}P -dCTP y se usó para ensayar las transferencias en las condiciones de astringencia alta siguientes: Hibridación de toda la noche a 65 °C en 6X SSC con agitación, un lavado de 5 minutos con 2x SSC/0,1 % SDS seguido de dos lavados de 10 minutos con 0,2x SSC/0,1 % SDS.

15

Se cribaron quince placas de biblioteca primaria (150mm) para hibridación con el fragmento de 515pb marcado. Se identificaron cuarenta placas con hibridación fuerte y diez de éstas se llevaron a un cribado secundario. Los plásmidos de cinco placas secundarias que hibridaron con la sonda de 515pb se escindieron con ExAssist Helper phage según el protocolo del proveedor (Stratagene). Las secuencias de nucleótidos de los insertos se obtuvieron usando el kit ABI Prism Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos fueron idénticas cuando se superpusieron, indicando que los cinco insertos eran del mismo gen. Se mostró que uno de los cinco insertos contenía la región codificadora completa, que se muestra más adelante que es de un gen de $\Delta 8$ desaturasa. Esta secuencia se proporciona como SEQ ID NO:6.

20

La secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID NO:1) reveló que el ADNc aislado codificaba una posible $\Delta 6$ o $\Delta 8$ desaturasa, tomando como base el análisis BLAST. Estos dos tipos de desaturasas son muy similares a nivel de aminoácidos y por lo tanto no fue posible predecir solo por la secuencia qué actividad estaba codificada. El grado máximo de identidad entre la desaturasa de *P. salina* y otras desaturasas (BLASTX) fue 27-30 %, mientras el análisis usando el programa GAP que permite las inserciones de "huecos" en el alineamiento mostró que la identidad global máxima de aminoácidos sobre las regiones codificadoras completas de la desaturasa de *P. salina* y AAD45877 de *Euglena gracilis* fue 45 %. Un diagrama de Pileup de otras secuencias similares a la desaturasa de *Pavlova salina* se proporciona en la Figura 4.

30

La región codificadora completa de este clon, contenida en un fragmento *EcoRI/XhoI*, se insertó en pYES2 (Invitrogen), generando pYES2-ps $\Delta 8$, para la introducción y caracterización funcional en levadura. Las células de la cepa de levadura S288 se transformaron con pYES2-ps $\Delta 8$ como se describe en el Ejemplo 1, y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Las células de levadura que contienen pYES2-ps $\Delta 8$ se crecieron en cultivo y se indujeron con galactosa. Después de la adición de 18:3 ω 3 o 20:3 ω 3 (0,5 mM) al medio de cultivo y 48 horas de cultivo adicional a 30 °C, los ácidos grasos en lípidos celulares se analizaron como se describe en el Ejemplo 1. Cuando 18:3 ω 3 ($\Delta 9$, 12, 15) se añadió al medio, no se detectó 18:4 ω 3 ($\Delta 6$, 9, 12, 15). Sin embargo, cuando 20:3 ω 3 ($\Delta 11,14,17$) se añadió al medio, se detectó la presencia de 20:4 ω 3 ($\Delta 8,11,14,17$) en el lípido celular de los transformantes de levadura (0,12 %). Se concluyó que el transgén codificaba un polipéptido que tenía actividad $\Delta 8$ pero no $\Delta 6$ desaturasa en células de levadura.

40

El aislamiento de un gen que codifica una $\Delta 8$ ácido graso desaturasa que no tiene también actividad $\Delta 6$ desaturasa no se ha informado anteriormente. El único gen del que se ha informado anteriormente que codifica una $\Delta 8$ desaturasa que se aisló (de *Euglena gracilis*) fue capaz de catalizar la desaturación de ambos 18:3 ω 3 y 20:3 ω 3 (Wallis y Browse, 1999). Además, la expresión de un gen que codifica una $\Delta 8$ desaturasa no se ha informado anteriormente en plantas superiores.

50

Como se muestra en la Figura 1, la expresión de una $\Delta 8$ desaturasa en concierto con una $\Delta 9$ elongasa (por ejemplo, el gen que codifica ELO2 - véase más adelante) y una $\Delta 5$ desaturasa (por ejemplo, el gen $\Delta 5/\Delta 6$ de pez cebra o un equivalente de *P. salina* u otra microalga) causaría la síntesis de EPA en plantas.

Además de proporcionar una ruta alternativa para la producción de EPA en células, la estrategia de usar una $\Delta 9$ elongasa en combinación con la $\Delta 8$ desaturasa puede proporcionar una ventaja en que la elongación, que ocurre sobre los ácidos grasos acoplados a CoA, precede la desaturación, que ocurre sobre los ácidos grasos acoplados a PC, asegurando de esta manera la disponibilidad del C20 PUFA recién elongado en PC para desaturaciones posteriores por $\Delta 8$ y $\Delta 5$ desaturasas, dando lugar posiblemente a una síntesis más eficiente de EPA. Esto es, el orden de las reacciones - una elongación seguida de dos desaturaciones - reducirá el número de cambios que ligan sustrato necesarios. La especificidad incrementada proporcionada por la $\Delta 8$ desaturasa de *P. salina* es una ventaja adicional.

60

Ejemplo 7. Aislamiento de elongasas de ácido graso ELO1 y ELO2 de *P. salina*

65

Las elongasas de PUFA de tipo ELO de organismos tales como nematodos, hongos y musgos se han identificado

tomando como base EST o estrategias de secuenciación del genoma. Un gen que codifica una $\Delta 9$ elongasa con actividad sobre 18:3 ω 3 (ALA) se aisló de *Isochrysis galbana* usando una estrategia de PCR con cebadores degenerados, y mostró que tiene actividad en células de levadura a las que se suministró 18:2 ω 6 (LA) o 18:3 ω 3 (ALA) exógenos, formando ácidos grasos C20 20:2 ω 6 y 20:3 ω 3 respectivamente. La región codificadora del gen *IgASE1* codificó una proteína de 263 aminoácidos con un peso molecular predicho de aproximadamente 30kDa y con homología limitada (hasta 27 % de identidad) con otras proteínas que elongan.

Aislamiento de fragmentos de gen elongasa de *P. salina*

Tomando como base alineamientos de secuencias de aminoácidos múltiples para ácido graso elongasas se identificaron los bloques de aminoácidos consenso FLHXYH (SEQ ID NO:48) y MYXYF (SEQ ID NO:49) y se sintetizaron los cebadores degenerados correspondientes 5'-CAGGATCCTTYTNCATNNNTAYCA-3' (SEQ ID NO:50) (con sentido) y 5'-GATCTAGARAARTARTANNRTACAT-3' (SEQ ID NO:51) (antisentido). Los cebadores diseñados para el resto FLHXYH o su uso en combinación con el cebador MYXYF no se han descrito anteriormente. Estos cebadores se usaron en reacciones de amplificación por PCR en volúmenes de reacción de 20 μ L con 20pmoles de cada cebador, 200ng de ADN genómico de *P. salina* y ADN polimerasa Hotstar Taq (Qiagen) con componentes de tampón y nucleótidos como se especifica por el proveedor. Las reacciones se ciclaron como sigue: 1 ciclo de 95 °C durante 15 minutos, 5 ciclos de 95 °C, 1min, 38 °C, 1min, 72 °C, 1min, 35 ciclos de 95 °C, 35 seg, 52 °C, 30 seg, 72 °C, 1min, 1 ciclo de 72 °C, 10min. Se generaron fragmentos de aproximadamente 150pb y se ligaron en pGEM-Teasy para análisis de secuencia.

De los 35 clones aislados, dos clones tenían secuencia de nucleótidos o aminoácidos con similitud con elongasas conocidas. Éstos se designaron Elo1 y Elo2. Ambos fragmentos génicos se radio-marcaron con ³²P-dCTP y se usaron para ensayar la biblioteca de ADNc de *P. salina* en las condiciones de astringencia alta siguientes: hibridación de toda la noche a 65 °C en 6X SSC con agitación, un lavado de 5 minutos con 2x SSC/0,1 % SDS seguido de dos lavados de 10 minutos con 0,2x SSC/0,1 % SDS. Se cribaron diez placas de biblioteca primaria (150mm) usando las sondas Elo1 o Elo2. Elo1 hibridó fuertemente con varias placas en cada placa, mientras Elo2 hibridó con solo tres placas en las diez placas cribadas. Todas las placas que hibridaron con Elo1 se tomaron de una única placa y se llevaron a un cribado secundario, mientras las tres placas que hibridaron con Elo2 se llevaron a un cribado secundario. Cada placa secundaria se usó como un molde de PCR usando los cebadores directos e inversos que flanquean el sitio de clonación múltiple en el fagémido pBluescript y los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel 1 % TAE. Después de la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana Hybond N+ y la membrana se hibridó toda la noche con sondas Elo1 y Elo2 marcadas con ³²P. Seis de las placas secundarias Elo1 amplificadas y una de las placas secundarias Elo2 amplificadas hibridaron con la sonda Elo 1/2 (Figura 5).

Se identificaron dos clases de secuencias semejantes a elongasa en la biblioteca de ADNc de *P. salina* tomando como base su hibridación con las sondas Elo1 y Elo2. Los fagémidos que hibridaron fuertemente con cualquier fragmento marcado se escindieron con ExAssist Helper phage (Stratagene), y se secuenciaron usando el kit ABI Prism Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems). Se mostró que todos los 5 insertos que hibridaron con la sonda Elo1 eran del mismo gen. De manera similar, la secuenciación de ADN de los 2 insertos que hibridaron con la sonda Elo2 mostró que eran del mismo gen. La secuencia de ADNc del clon Elo1 se proporcióna como SEQ ID NO:8, y la proteína codificada como SEQ ID NO:2, mientras la secuencia de ADNc del clon Elo2 se proporcióna como SEQ ID NO:10, y las proteínas codificadas como SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:85 y SEQ ID NO:86 usando tres posibles metioninas de inicio).

Se realizó una comparación de Elo1 y Elo2 y otras elongasas de PUFA conocidas de la base de datos usando el software PILEUP (NCBI), y se muestra en la Figura 6.

El ADNc de Elo1 tuvo una longitud de 1.234 nucleótidos y tuvo un marco de lectura abierto que codificaba una proteína de 302 residuos de aminoácidos. Según el análisis PILEUP, Elo1 se agrupaba con otras secuencias de tipo Elo asociadas con la elongación de PUFA incluyendo ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados (Figura 6). La proteína Elo1 mostró el mayor grado de identidad (33 %) con una elongasa del musgo, *P. patens* (No. de Registro AF428243) a lo largo de las regiones codificadoras completas. La proteína Elo1 también presentó restos de aminoácidos conservados encontrados en todas las demás elongasas de tipo Elo.

El ADNc de Elo2 tuvo una longitud de 1.246 nucleótidos y tuvo un marco de lectura abierto que codificaba una proteína de 304 residuos de aminoácidos. Según el análisis PILEUP, Elo2 se agrupaba con otras secuencias de tipo Elo asociadas con la elongación de PUFA, incluyendo aquellas con actividad sobre PUFA $\Delta 6$ o $\Delta 9$ (Figura 6). Elo2 estaba en la misma sub-rama que la $\Delta 9$ elongasa aislada de *Isochrysis galbana* (AX571775). Elo2 presentó 31 % de identidad con el gen de *Isochrysis* a lo largo de su región codificadora completa. El ORF de Elo2 también presentó un resto de aminoácidos conservado encontrado en todas las demás elongasas de tipo Elo.

Ejemplo 8. Caracterización funcional de ácido graso $\delta 5$ elongasa en células de levadura y en plantas

Levadura

La región codificadora completa del gen *Elo1* de *P. salina* se ligó en pYES2, generando pYES2-psELO1, para caracterización en levadura. Esta construcción genética se introdujo en cepas de levadura y se ensayó para actividad por crecimiento en medios que contenían ácidos grasos exógenos como se lista en la Tabla 8. Las células de levadura que contenían pYES2-psELO1 fueron capaces de convertir 20:5 ω 3 en 22:5 ω 3, confirmando actividad Δ 5 elongasa en sustrato C20. La proporción de conversión de 7 % indicó actividad alta para este sustrato. Las mismas células de levadura convirtieron 18:4 ω 3 (Δ 6,9,12,15) en 20:4 ω 3 y 18:3 ω 6 (Δ 6,9,12) en 20:3 ω 6, demostrando que la elongasa también tenía actividad Δ 6 elongasa en células de levadura, pero a proporciones de conversión aproximadamente 10 veces menores (Tabla 8). Esto indicó que el gen *Elo1* codifica una Δ 5 elongasa específica o selectiva en células de levadura. Esto representa el primer informe de una Δ 5 elongasa específica, concretamente una enzima que tiene una mayor actividad Δ 5 elongasa cuando se compara con la actividad Δ 6 elongasa. Esta molécula es también la primera Δ 5 elongasa aislada de una fuente de algas. Esta enzima es crítica en la conversión de EPA en DPA (Figura 1).

Plantas

La Δ 5 elongasa, *Elo1* aislada de *Pavlova* se expresa en plantas para confirmar su capacidad de funcionar en plantas. En primer lugar, se hace una construcción de expresión de planta para la expresión constitutiva de *Elo1*. Para este propósito, la secuencia de *Elo1* se pone bajo el control del promotor 35S en el vector binario de plantas pBI121 (Clontech). Esta construcción se introduce en *Arabidopsis* usando el método de inmersión floral descrito anteriormente. El análisis de los lípidos de las hojas se usa para determinar la especificidad de ácidos grasos elongados por la secuencia *Elo1*. En otra estrategia, la co expresión de la construcción *Elo1* con la construcción Δ 5/ Δ 6 desaturasa de pez cebra/elongasa de *C. elegans* y la Δ 4 desaturasa aislada de *Pavlova*, resulta en la síntesis de DHA a partir de ALA en semilla de *Arabidopsis*, demostrando el uso de la Δ 5 elongasa en la producción de DHA en células. En una estrategia adicional, el gen *Elo1* puede co-expresarse con los genes de Δ 6-desaturasa y Δ 5 desaturasa, o un gen de Δ 6/ Δ 5 desaturasa bifuncional, para producir DPA a partir de ALA en células, particularmente células de planta. En una estrategia alternativa, los genes de Δ 5 elongasa y Δ 4 elongasa se usan en combinación con los genes PKS de *Shewanella* que producen EPA (Takeyama et al., 1997), en plantas, para la síntesis de DHA.

TABLA 8. Conversión de ácidos grasos en células de levadura transformadas con construcciones genéticas que expresan *Elo1* o *Elo2*.

Clon	Precursor de ácido graso/ (% de FA total)	Ácido graso formado/ (% de FA total)	Proporción de conversión (%)
pYES2-psELO1	20:5n-3 / 3 %	22:5n-3 / 0,21 %	7 %
pYES2-psELO1	18:4n-3 / 16,9 %	20:4n-3 / 0,15 %	0,89 %
pYES2-psELO1	18:3n-6 / 19,8 %	20:3n-6 / 0,14 %	0,71 %
pYES2-psELO2	20:5n-3 / 2,3 %	22:5n-3 / tr	-
pYES2-psELO2	18:4n-3 / 32,5 %	20:4n-3 / 0,38 %	1,2 %
pYES2-psELO2	18:3n-6 / 12,9 %	20:3n-6 / 0,08 %	0,62 %
pYES2-psELO2	18:2n-6 / 30,3 %	20:2n-6 / 0,12 %	0,40 %
pYES2-psELO2	18:3n-3 / 42,9 %	18:3n-3 / 0,20 %	0,47 %

tr: cantidades traza (<0,02 %) detectadas.

Ejemplo 9. Caracterización funcional de ácido graso δ 9 elongasa en células de levadura y en plantas

Expresión en células de levadura

La región codificadora completa del gen *Elo2* de *P. salina* que codifica una proteína de 304 aminoácidos (SEQ ID NO:3) se ligó en pYES2, generando pYES2-psELO2, para caracterización en levadura. Esta construcción genética se introdujo en cepas de levadura y se ensayó para actividad por crecimiento en medios que contenían ácidos grasos exógenos. Las células de levadura que contienen pYES2-psELO2 fueron capaces de convertir 18:2 ω 6 (0,12 % de ácidos grasos totales) y 18:3 ω 3 en 20:3 ω 3 (0,20 %), confirmando actividad Δ 9 elongasa sobre sustratos C18 (Tabla 8). Estas células también fueron capaces de convertir 18:3 ω 6 en 20:3 ω 6 y 18:4 ω 3 en 20:4 ω 3, confirmando actividad Δ 6 elongasa sobre sustratos C18 en levadura. Sin embargo, como los sustratos 18:3 ω 6 y 18:4 ω 3 también tienen una desaturación en la posición Δ 9, podría ser que la enzima *Elo2* sea específica para ácidos grasos Δ 9-desaturados, independientemente de si también tienen una Δ 6 desaturación. Las células fueron capaces de convertir 20:5 ω 3 en el producto DPA 22:5. Éste es el primer informe de una Δ 9 elongasa que también tiene actividad Δ 6 elongasa de una fuente de no vertebrado, en particular de una fuente de hongo o alga.

Como la región codificadora contenía tres posibles codones de inicio ATG correspondientes a aminoácidos de metionina (Met) en las posiciones 1, 11 (SEQ ID NO:85) y 29 (SEQ ID NO:86) de SEQ ID NO:3, se ensayó la posibilidad de que los polipéptidos que empiezan en las posiciones de aminoácidos 11 o 29 también fueran activos. Usando cebadores oligonucleotídicos 5' (con sentido) correspondientes a las secuencias de nucleótidos de estas

regiones, se llevó a cabo la amplificación por PCR de las regiones codificadoras, y los productos resultantes se digirieron con *EcoRI*. Los fragmentos se clonaron en pYES2 para formar pYES2-psELO2-11 y pYES2-psELO2-29. Se muestra que ambos plásmidos codifican enzimas $\Delta 9$ -elongasa activas en levadura. Los tres polipéptidos también pueden expresarse en *Synechococcus* u otras células tales como células de planta para demostrar actividad.

5

Expresión en células de planta

El gen de $\Delta 9$ elongasa, Elo2, aislado de *Pavlova* se expresó en plantas para confirmar su capacidad de funcionar en plantas. En primer lugar, se hace una construcción de expresión de planta para la expresión constitutiva de Elo2. Para este propósito, la secuencia codificadora de Elo2 desde la posición de aminoácido 1 de SEQ ID NO:3 se puso bajo el control del promotor 35S en el vector binario de planta pBI121 (Clontech). Esta construcción se introduce en *Arabidopsis* usando el método de inmersión floral descrito anteriormente. El análisis de los lípidos de las hojas indica la especificidad de ácidos grasos que son elongados por la secuencia Elo2.

10

Co-expresión de los genes de $\Delta 9$ elongasa y $\Delta 8$ -desaturasa en células transformadas

La $\Delta 8$ -desaturasa y $\Delta 9$ -elongasa de *P. salina* se clonaron en un único vector binario, cada una bajo el control del promotor constitutivo 35S y terminador *nos*. En esta construcción génica, se cortó pBI121 que contiene la secuencia $\Delta 8$ -desaturasa con *HindIII* y *Clal* (con extremos romos) para liberar un fragmento que contiene el promotor 35S y el gen de $\Delta 8$ -desaturasa, que se ligó en el vector pXZP143/ $\Delta 9$ -elongasa cortado con *HindIII* + *SacI* (con extremos romos) para resultar en el intermedio pJRP013. Este intermedio se abrió con *HindIII* y se ligó con un vector binario pWvec8/ $\Delta 9$ -elongasa (también abierto con *HindIII*) para resultar en la construcción pJRP014, que contiene ambos genes entre los extremos izquierdo y derecho de T-ADN, junto con un gen marcador seleccionable de higromicina adecuado para la transformación de plantas.

20

25

Esta construcción de doble gen se usó para transformar tabaco usando una técnica de transformación mediada por *Agrobacterium* estándar. Después de la introducción de la construcción en la cepa de *Agrobacterium* AGL1, se usó una única colonia transformada para inocular 20 mL de medio LB y se incubó con agitación durante 48 horas a 28 °C. Las células se sedimentaron (1.000 g durante 10 minutos), el sobrenadante se desechó, y el sedimento se resuspendió en 20 mL de medio MS estéril. Esta etapa se repitió antes de añadir 10 ml de esta solución de *Agrobacterium* a hojas de tabaco recién cortadas (cuadrados de 1 cm) del cultivar W38. Después de un mezclado suave, se dejaron los trozos de hoja de tabaco y solución de *Agrobacterium* permanecer a temperatura ambiente durante 10 min. Los trozos de hoja se transfirieron a placas MS, se sellaron, y se incubaron (co-cultivo) durante 2 días a 24 °C. Las células transformadas se seleccionaron en medio que contenía higromicina, y se regeneraron brotes. Estos brotes se cortaron y se transfirieron a macetas con medio de enraizamiento MS para el crecimiento de la raíz, y eventualmente se transfirieron a tierra. Los lípidos tanto de la hoja como semilla de estas plantas se analizaron para la presencia de ácidos grasos 20:2 ω 6, 20:3 ω 6, 20:3 ω 3 y 20:4 ω 3, demostrando la co-expresión de los dos genes.

30

35

Discusión

La evidencia bioquímica sugiere que la elongación de ácidos grasos consiste en 4 etapas: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción, y la reacción está catalizada por un complejo de cuatro proteínas, la primera de las cuales cataliza la etapa de condensación y se denomina comúnmente la elongasa. Hasta ahora hay 2 grupos identificados de enzimas de condensación. El primero está implicado en la síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (C18-22). Éstos son las enzimas semejantes a FAE y no juegan ningún papel en la biosíntesis de LC-PUFA. La otra clase de elongasas identificada pertenecen a la familia ELO de elongasas que se denominan como la familia de genes ELO cuyas actividades se requieren para la síntesis de los ácidos grasos muy LC de esfingolípidos en levadura. Se ha mostrado que los paralogos aparentes de las elongasas de tipo ELO aislados de los organismos que sintetizan LC-PUFA como algas, musgos, hongos y nematodos están implicados en la elongación y síntesis de LC-PUFA. Se ha mostrado que solo se requiere la expresión del componente de condensación de la elongasa para la elongación de la cadena acilo respectiva. Así, el componente de condensación de la elongasa introducido es capaz de reclutar con éxito las actividades de reducción y deshidratación del huésped transgénico para llevar a cabo las elongaciones de acilo con éxito. Esto también fue cierto para la $\Delta 9$ -elongasa de *P. salina*.

50

55

Ejemplo 10. Aislamiento de un gen que codifica una $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*

La etapa final en la ruta aeróbica de la síntesis de DHA en organismos distintos de vertebrados, tales como microorganismos, plantas inferiores incluyendo algas, musgos, hongos, y posiblemente animales inferiores, está catalizada por una $\Delta 4$ -desaturasa que introduce un enlace doble en la cadena de carbono del ácido graso en la posición $\Delta 4$. Los genes que codifican dicha enzima se han aislado de las algas *Euglena* y *Pavlova* y de *Thraustochytrium*, usando diferentes estrategias. Por ejemplo, los genes de $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova lutheri* y *Euglena gracilis* se aislaron por secuenciación aleatoria de EST clonados (estrategia EST, Meyer et al., 2003; Tonon et al., 2003), y un gen de $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium* sp. ATCC21685 se aisló por RT-PCR usando cebadores correspondientes a un dominio de citocromo b₅ HPGG y la región de caja de histidina III (Qiu et al., 2001).

60

65

Los genes de $\Delta 4$ -desaturasa clonados codificaron desaturasas de extremo frontal cuyos miembros se caracterizan por la presencia de un dominio semejante a citocromo b_5 N terminal (Napier et al., 1999; Sayanova y Napier, 2004).

Aislamiento de un fragmento génico de un gen de $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*

La comparación de $\Delta 4$ -desaturasas de musgo y microalga conocidas reveló varios restos conservados incluyendo un resto HPGG (SEQ ID NO:52) en un dominio semejante a citocromo b_5 y tres restos de caja de histidina que se presume que se requieren para la actividad. Se diseñaron nuevos cebadores degenerados de PCR PavD4Des-F3 (5'-AGCACGACGSSARCCACGGCG-3') (SEQ ID NO:53) y PavD4Des-R3 (5'-GTGGTGCAVCABCACGTGCT-3') (SEQ ID NO:54) correspondientes a la secuencia de aminoácidos conservada de la caja de histidina I y complementarios a una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la caja de histidina II, respectivamente, para amplificar la región correspondiente de los genes de desaturasa de *P. salina*, particularmente un gen de $\Delta 4$ -desaturasa. El uso de cebadores de PCR degenerados correspondientes a las regiones de caja de histidina I y caja de histidina II de $\Delta 4$ -desaturasa no se ha informado anteriormente.

Las reacciones de amplificación por PCR usando estos cebadores se llevaron a cabo usando ADNc de primera cadena de *P. salina* como molde con ciclado de 95 °C, 5min durante 1 ciclo, 94 °C 30 seg, 57 °C 30 seg, 72 °C 30 seg durante 35 ciclos, y 72 °C 5 min durante 1 ciclo. Los productos de PCR se clonaron en vectores pGEM-T-easy (Promega), y se determinaron las secuencias de nucleótidos con un secuenciador automático ABI3730 usando un cebador inverso del vector pGEM-Teasy. Entre los 14 clones secuenciados, tres clones mostraron homología con genes de $\Delta 4$ -desaturasa. Dos de estos tres clones están truncados en un extremo de cebador. La secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc del tercero, clon 1803, se proporciona como SEQ ID NO: 11.

La secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:11 se usó para buscar en la base de datos de secuencia de proteína NCBI usando el software BLASTX. Los resultados indicaron que esta secuencia era homóloga a $\Delta 4$ -desaturasas conocidas. La secuencia de aminoácidos del fragmento génico de *P. salina* mostró 65 %, 49 %, 46 % y 46 % de identidad con la de $\Delta 4$ -desaturasas de *P. lutheri*, *Thraustochytrium* sp. ATCC21685, *Thraustochytrium aureum* y *Euglena gracilis*, respectivamente.

Aislamiento de un de $\Delta 4$ -desaturasa de longitud completa

El inserto del clon 1803 se escindió, y se usó como sonda para aislar ADNc de longitud completa correspondientes al posible fragmento génico de $\Delta 4$ -desaturasa. Aproximadamente 750.000 pfu de la biblioteca de ADNc de *P. salina* se cribaron a astringencia alta. La hibridación se realizó a 60 °C toda la noche y el lavado se hizo con 2xSSC/0,1 %SDS 30min a 65 °C y con 0,2xSSC/0,1 %SDS 30min a 65 °C. Dieciocho clones que hibridaban se aislaron y el cribado secundario con seis clones se realizó en las mismas condiciones de hibridación. Se aislaron placas únicas del cribado secundario de estos seis clones. Los plásmidos de cinco placas únicas se escindieron y se determinaron las secuencias de nucleótidos de los insertos con un secuenciador automático ABI 3730 con cebadores inversos y directos del vector. Los resultados de la secuenciación mostraron que cuatro clones contenían cada uno ADNc de $\Delta 4$ -desaturasa de aproximadamente 1,7kb de longitud, cada uno con la misma secuencia codificadora y cada uno aparentemente de longitud completa. Se diferenciaban ligeramente en la longitud de los UTR 5' y 3' aunque contenían regiones codificadoras de proteína idénticas. La secuencia de ADNc del ADNc más largo de $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina* se proporciona como SEQ ID NO: 13, y la proteína codificada como SEQ ID NO:4.

El ADNc de longitud completa tenía una longitud de 1.687 nucleótidos y tenía una región codificadora que codificaba 447 aminoácidos. La $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* mostró todos los restos conservados típicos de 'desaturasas de extremo frontal' incluyendo el dominio semejante a citocromo b_5 N-terminal y tres restos ricos en histidina conservados. La comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con otros genes de $\Delta 4$ -desaturasa mostró que el mayor grado de homología fue para la $\Delta 4$ -desaturasa de *P. lutheri* (No. de Registro AY332747), que fue 69,4 % idéntica en la secuencia de nucleótidos sobre la región codificadora de la proteína, y 67,2 % idéntica en la secuencia de aminoácidos.

Demostración de actividad enzimática del de $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina*

Un fragmento de ADN que incluía la región codificadora de ADNc de $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina* se escindió como un fragmento de ADNc *EcoRI-SalI* y se insertó en el vector de expresión de levadura pYES2 usando los sitios *EcoRI* y *XhoI*. El plásmido resultante se transformó en células de levadura. Los transformantes se crecieron en medio YMM y el gen se indujo por la adición de galactosa, en presencia de ácidos grasos $\omega 6$ y $\omega 3$ añadidos (exógenos) con el fin de demostrar actividad enzimática y el rango de sustratos sobre el que podría actuar el gen expresado. Los ácidos grasos 22:5 $\omega 3$ (DPA, 1,0mM), 20:4n-3 (ETA, 1,0mM), 22:4 $\omega 6$ (DTAG, 1,0 mM) y 20:4 $\omega 6$ (ARA, 1,0mM) se añadieron cada uno separadamente al medio. Después de 72 horas de incubación, las células se recogieron y los análisis de ácidos grasos se realizaron por cromatografía gas-líquida (GC) capilar como se describe en el Ejemplo 1. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9. Alimentación de PUFA en levadura que muestra la actividad del gen delta-4 desaturasa.

Composición de ácidos grasos (% de ácido graso total)	Ácido graso exógeno añadido al medio de crecimiento	
	22:4 ω 6	22:5 ω 3
14:0	0,63	0,35
15:0	0,06	0,06
16:1 ω 7c	43,45	40,52
16:1 ω 5	0,20	0,13
16:0	18,06	15,42
17:1 ω 8	0,08	0,09
17:0	0,08	-
18:1 ω 9	26,73	30,07
18:1 ω 7 (principal) y 18:3 ω 3	1,43	1,61
18:1 ω 5c	0,02	tr
18:0	7,25	8,87
20:5 ω 3	0,40	0,62
20:1 ω 9/ ω 11	0,03	tr
20:0	0,08	0,09
22:5 ω 6	0,03	0,00
22:6 ω 3	-	0,04
22:4 ω 6	0,97	-
22:5 ω 3	0,00	1,66
22:0	0,06	0,06
24:1 ω 7	0,31	0,37
24:0	0,12	0,04
Suma	100,00 %	100,00 %

5 Esto mostró que el gen clonado codificaba una Δ 4-desaturasa que fue capaz de desaturar tanto C22:4 ω 6 (3,0 % conversión en 22:5 ω 6) como C22:5 ω 3 (2,4 % conversión en 22:6 ω 3) en la posición Δ 4. La enzima no mostró ninguna actividad de Δ 5 desaturación cuando los transformantes de levadura se alimentaron con C20:3 ω 6 o C20:4 ω 3.

Ejemplo 11. Expresión del gen de Δ 4-desaturasa de *P. salina* en células de planta y producción de DHA

10 Para demostrar la actividad del gen de Δ 4-desaturasa en células de planta, la región codificadora puede expresarse bien separadamente para permitir la conversión de DPA en DHA, o en el contexto de otros genes de síntesis de LC-PUFA tal como, por ejemplo, un gen de Δ 5-elongasa para la conversión de EPA en DHA. Para la expresión como un gen separado, la región codificadora de Δ 4-desaturasa puede escindirse como un fragmento *Bam*HI-*Sa*II e insertarse entre un promotor específico de semilla y una secuencia de poliadenilación/terminación de la transcripción, tal como, por ejemplo, en el vector pGNAP (Lee et al., 1998), de manera que se expresa bajo el control del promotor específico de semilla. El casete de expresión puede insertarse en un vector binario e introducirse en células de planta. El material de planta usado para la transformación puede ser bien plantas no transformadas o plantas transformadas que contienen una construcción que expresaba el gen de Δ 5/ Δ 6-desaturasa dual de pez cebra y el gen de elongasa de *C. elegans* cada uno bajo el control de un promotor específico de semilla (Ejemplo 5). *Arabidopsis* transgénicos que contienen la última, construcción génica dual produjeron con éxito EPA y DPA en semillas, y la combinación con el gen Δ 4-desaturasa permitiría la conversión del DPA en DHA en las células de planta, como se demuestra más adelante.

25 Para demostrar co-expresión de un gen de Δ 5-elongasa con el gen de Δ 4-desaturasa en células recombinantes, particularmente células de planta, y permitir la producción de DHA, los genes de Δ 4-desaturasa y Δ 5-elongasa de *P. salina* (Ejemplo 8) se combinaron en un vector binario como sigue. Ambas regiones codificadoras se pusieron bajo el control de promotores específicos de semilla (*napin*) y terminadores *nos3'*, y la construcción de vector binario tenía un gen de resistencia a kanamicina como un marcador seleccionable para la selección en células de planta. La región codificadora del gen de Δ 5-elongasa se escindió de su clon de ADNc como un fragmento *Pst*I-*Sa*II y se insertó en un plásmido intermedio (pXZP143) entre el promotor y el terminador, resultando en el plásmido pXZP144. La región codificadora del gen de Δ 4-desaturasa se escindió de su clon de ADNc como un fragmento *Bam*HI-*Sa*II y se insertó en el plásmido pXZP143 entre el promotor y el terminador de la transcripción *nos 3'*, resultando en el

plásmido pXZP150. Estos dos casetes de expresión se combinaron en un vector insertando el fragmento *HindIII*-*Apal* de pXZP144 (que contiene promotor-Elo1-nos3') entre los sitios *Stul* y *Apal* de pXZP150, resultando en el plásmido pXZP191. El fragmento *HindIII*-*Stul* de pXZP191 que contiene ambos casetes de expresión se clonó en el vector binario pXZP330, un derivado de pBI121, resultando en el vector de expresión en plantas pXZP355. Este vector se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

Transformación de plantas

Los genes de $\Delta 5$ -elongasa y $\Delta 4$ -desaturasa en pXZP355 se introdujeron por el método de transformación por inmersión floral mediado por *Agrobacterium* en las plantas de *Arabidopsis* designadas DO11 (Ejemplo 5) que ya eran transgénicas para los genes de $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional de pez cebra y $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional de *C. elegans*. Como estos transgenes estaban ligados con un gen de resistencia a higromicina como un gen marcador seleccionable, la transformación secundaria con pXZP355 usó una selección de resistencia a kanamicina, distinguiendo así los dos conjuntos de transgenes. Se obtienen cinco plantas transgénicas, designadas plantas "DW". Como las plantas DO11 se segregaron para los genes de $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional de pez cebra y $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional de *C. elegans*, se esperaba que algunas de las plantas transformadas fueran heterocigotas para estos genes, mientras se esperaba que otras fueran homocigotas. La semilla (semilla T2) de las cinco plantas transformadas se analizaron y mostraron que contenían hasta al menos 0,1 % DPA y hasta al menos 0,5 % DHA en los aceites de la semilla. Los datos se presentan para dos líneas en la Tabla 10. El análisis, por espectrometría de masas (GC-MS), de los ácidos grasos en los picos identificados como EPA y DHA del análisis GC probó que eran de hecho EPA y DHA (Figura 8).

El análisis de ácidos grasos del aceite de semilla T2 demostró que se había producido una conversión significativa de EPA en DHA en las líneas DW2 y DW5, teniendo 0,2 % y 0,5 % DHA, respectivamente. El examen de las eficiencias enzimáticas en la planta DW5 que contiene el mayor nivel de DHA mostró que 17 % del EPA producido en su semilla se elongó a DPA por la $\Delta 5$ -elongasa de *P. salina*, y más del 80 % de este DPA se convirtió en DHA por la $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*. Como los genes de $\Delta 5$ -elongasa y $\Delta 4$ -desaturasa se segregaban en la semilla T2, los datos de composición de ácidos grasos representaron un promedio de genotipos combinados nulos, heterocigoto y homocigoto para estos genes. Se espera que los niveles de DHA en las líneas de progenie de DW5 serán mayores en semilla que es uniformemente homocigota para estos genes.

TABLA 10. Composición de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) de aceites de semilla de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) y derivados que portan construcciones génicas de EPA y DHA - síntesis de EPA, DPA y DHA en semillas transgénicas.

Ácido graso	Tipo silvestre	Construcción DO11 + DHA			
	Columbia	DW2	DW5	TAG	PL
Ácidos grasos habituales					
16:0	7,2	6,7	6,1	5,5	12,5
18:0	2,9	3,8	4,4	4,3	4,5
18:1 Δ ⁹	20,0	20,6	16,6	18,9	13,7
18:2 Δ ^{9,12} (LA)	27,5	26,0	25,9	25,5	33,1
18:3 Δ ^{9,12,15} (ALA)	15,1	13,2	15,0	13,6	15,1
20:0	2,2	2,1	1,8	1,9	0,6
20:1 Δ ¹¹	19,8	14,8	10,5	10,5	3,2
20:1 Δ ¹³	2,2	3,0	4,2	4,8	1,4
20:2 Δ ^{11,14}	0,1	1,7	3,5	3,8	3,7
22:1 Δ ¹³	1,5	1,4	1,0	0,3	0,4
Otros menores	1,5	2,9	2,7	2,4	3,8
Total	100,0	96,0	91,7	91,5	92,0
Nuevo $\omega 6$-PUFA					
18:3 Δ ^{6,9,12} (GLA)	0	0,2	0,4	0,4	0,2
20:3 Δ ^{8,11,14}	0	0,8	1,5	1,5	1,7
20:4 Δ ^{5,8,11,14} (ARA)	0	0,4	1,0	1,1	1,2
22:4 Δ ^{7,10,13,16}	0	0	0	0	0,2
22:5 Δ ^{4,7,10,13,16}	0	0	0,1	0,1	0,1
Total	0	1,4	3,0	3,1	3,4
Nuevo $\omega 3$-PUFA					

18:4 Δ	6,9,12,15 (SDA)	0	0,7	1,5	1,6	0,5
20:4 Δ	8,11,14,17	0	0,5	0,8	0,7	0,9
20:5 Δ	5,8,11,14,17 (EPA)	0	1,1	2,4	2,5	2,3
22:5 Δ	7,10,13,16,19 (DPA)	0	0,1	0,1	0,2	0,7
22:6 Δ	4,7,10,13,16,19 (DHA)	0	0,2	0,5	0,4	0,2
Total		0	2,6	5,3	5,4	4,6
Ácidos grasos totales		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<hr/>						
MUFA ^a Total		41,3	36,8	28,1	29,7	17,3
C ₁₈ -PUFA ^b Total		42,6	39,2	40,9	39,1	48,2
Nuevo PUFA ^c Total		0	4,0	8,3	8,5	8,0

^a Total de 18:1 Δ^9 y LC-MUFA derivado (=18:1 Δ^9 + 20:1 Δ^{11} + 22:1 Δ^{13})

^b 18:2 + 18:3

^c Total de todos los PUFA nuevos ω_6 y ω_3

5 La germinación de 50 semillas T2 de cada uno de DW2 y DW5 en medio que contenía higromicina mostró que la planta DW5 T1 era homocigota (50/50) para los genes de $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa bifuncional y $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, mientras la semilla DW2 se segregaba en una proporción 3:1 (resistente: susceptible) para estos genes y DW2 era por lo tanto heterocigota. Esto fue consistente con los mayores niveles de EPA observados en las semillas DW5 comparado con las semillas DW2, y explicó el nivel incrementado de DHA producido en las semillas homocigotas para estos transgenes. Esto demuestra adicionalmente la conveniencia de semillas que son homocigotas para el rasgo.

10 También observamos las consecuencias de la síntesis de LC-PUFA en el perfil de ácidos grasos total en estas semillas. Aunque observamos acumulación de nuevos PUFA ω_6 y ω_3 (es decir, productos de $\Delta 6$ -desaturación) a niveles de más de 8 % en semillas DW5, estas semillas tenían niveles de los ácidos grasos precursores LA y ALA que eran casi iguales que en las semillas de tipo silvestre. En lugar de deplecionar LA y ALA, los niveles de ácido graso monoinsaturado C₁₈:1 Δ^9 y sus derivados elongados (20:1 Δ^{11} y 22:1 Δ^{13}) se redujeron significativamente. Así, parecía que la conversión de C₁₈-PUFA en LC-PUFA resultaba en la conversión incrementada de 18:1 en LA y ALA, y una reducción correspondiente en 18:1 disponible para la elongación.

20 El vector de expresión de plantas pXZP355 que contiene los genes de $\Delta 4$ -desaturasa y $\Delta 5$ -elongasa también se usó para introducir los genes en plantas de la línea homocigota DO11-5, y se obtuvieron 20 plantas transgénicas T1. Los niveles de DHA y DPA en semillas T2 de estas plantas fueron similares a los observados en las semillas de DW5. También se observaron reducciones en los niveles de ácidos grasos monoinsaturados en estas semillas.

25 El fraccionamiento de los lípidos totales de las semillas de las semillas DW5 reveló que estaban comprendidos por 89 % TAG y 11 % lípidos polares (compuestos en su mayor parte por fosfolípidos). Además, el análisis de ácidos grasos de la fracción TAG de las semillas DW5 mostró que los recién sintetizados EPA y DHA estaban siendo incorporados en el aceite de la semilla y que la proporción de EPA y DHA en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de las semillas reflejaba esencialmente el de la fracción TAG (Tabla 10).

30 Ejemplo 12. Aislamiento de genes homólogos de otras fuentes

35 Los homólogos de los genes de desaturasa y elongasa tales como los genes de *P. salina* descritos en la presente memoria pueden detectarse fácilmente en otras microalgas u otras fuentes por hibridación con sondas marcadas derivadas de los genes, particularmente con partes o todas las regiones codificadoras, por ejemplo por métodos de hibridación por transferencia Southern o hibridación en mancha. Los genes homólogos pueden aislarse de bibliotecas genómicas o de ADNc de dichos organismos, o por amplificación por PCR usando cebadores correspondientes a regiones conservadas. De manera similar, los homólogos de desaturasas de vertebrados con alta afinidad para Acil-CoA y/o desaturasas bifuncionales de peces de agua dulce pueden aislarse por medios similares usando sondas para la $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra.

40 Hibridaciones sobre mancha

45 El ADN genómico de seis especies de microalgas se aisló usando un kit DNAeasy (Qiagen) usando las instrucciones del proveedor, y se usó en análisis de hibridación sobre mancha para la identificación de genes homólogos implicados en la síntesis de LC-PUFA en estas especies. Esto también permitió la evaluación de la divergencia de las secuencias de dichos genes comparado con los aislados de *Pavlova salina*. Las especies de microalgas examinadas en este análisis fueron de los géneros *Melosira*, *Rhodomonas*, *Heterosigma*, *Nannochloropsis*, *Heterocapsa* y *Tetraselmis*. Se identificaron según Hasle, G. R. y Syvertsen, E. E. 1996 Dinoflagellates. En: Tomas, C. R.(ed.) Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego, CA. p 531-532. Estas microalgas se

incluyeron en el análisis tomando como base la presencia de EPA, DHA, o ambos cuando se cultivan *in vitro* (Ejemplo 2).

5 El ADN genómico (aproximadamente 100µg) aislado de cada una de las microalgas se depositó en tiras de membrana Hybond N+ (Amersham). Después de secar al aire, cada tira de membrana se puso en una capa de papel de filtro 3MM saturado con 0,4 M NaOH durante 20 min, para la desnaturalización del ADN, y se lavó brevemente en solución 2x SSC. Las tiras de membrana se secaron al aire y el ADN se entrecruzó a las membranas bajo luz UV. Las sondas marcadas con nucleótidos ³²P y que consistían en las regiones codificadoras sin las regiones no traducidas de varios genes derivados de *Pavlova*, incluyendo las Δ8, Δ5 y Δ4 desaturasas y Δ9 y Δ5 elongasas, se prepararon e hibridaron con cada tira de membrana/ADN sobre mancha. Las membranas se hibridaron con cada sonda toda la noche en tampón que contenía 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 1M NaCl, 50 % formamida, 10x solución de Denhardt, 10 % sulfato de dextrano, 1 % SDS, 0,1 % pirofosfato de sodio, y 0,1 mg/ml ADN de esperma de arenque, a 42 °C, se lavaron tres veces en una solución que contenía 2x SSC, 0,5 % SDS a 50 °C durante 15 min cada uno (lavado de astringencia baja en este experimento) o un lavado de astringencia alta en 15 0,2x SSC, 0,5 % SDS a 65 °C durante 20 minutos cada uno.

Es muy conocido que la astringencia de las condiciones de lavado empleadas en transferencia de ADN/hibridaciones puede revelar información útil respecto a la relación entre secuencias de genes. Así, las hibridaciones mantenidas cuando se someten a un lavado con astringencia alta indican un nivel alto de relación entre las secuencias (por ejemplo, 80 % o más de identidad de nucleótidos sobre al menos 100-200 nucleótidos), mientras las hibridaciones mantenidas solo durante lavados con astringencia baja indican un grado relativamente menor de conservación de ADN entre genes (por ejemplo, 60 % o más de identidad de nucleótidos sobre al menos 200 nucleótidos).

25 Las transferencias sobre mancha hibridadas se expusieron a película de rayos X BioMax (Kodak), y los autorradiogramas se muestran en la Figura 9. Los autorradiogramas revelan la presencia de homólogos de los genes LC-PUFA de *P. salina* en estas especies, y revelan además un rango de homologías basado en los diferentes niveles de hibridación observados en condiciones de astringencia alta y baja. Parecía que algunas de las especies de microalgas examinadas tenían genes de LC-PUFA que se podían diferenciar sustancialmente de los genes de *P. salina*, mientras otros estaban más relacionados en secuencia. Por ejemplo, resultó que los genes de *Tetraselmis sp* eran muy similares a las Δ4- y Δ5-desaturasas y la Δ5 elongasa de *Pavlova salina* tomando como base la fuerza de las hibridaciones. Por el contrario, resultó que todos los genes de LC-PUFA identificados en *Melosira sp* tenían grados menores de similitud con los genes de *P. salina*.

35 Aislamiento de un gen LC-PUFA elongasa de *Heterocapsa sp.*

Las *Heterocapsa spp.* tales como *Heterocapsa niei* en la colección CSIRO (Ejemplo 2) son dinoflagelados que se identificaron como productores de LC-PUFA incluyendo EPA y DHA. Para ejemplificar el aislamiento de los genes de síntesis de LC-PUFA de estos dinoflagelados, se purificó el ADN de células de una cepa de *Heterocapsa niei* aislada originalmente en Port Hacking, NSW, Australia en 1977. El ADN se aisló usando un kit DNAeasy (Qiagen) usando las instrucciones del proveedor. Tomando como base alineamientos publicados de secuencias de aminoácidos múltiples para elongasas de ácidos grasos (Qi et al., 2002; Parker-Barnes et al., 2000), se identificaron los bloques de aminoácidos consenso FLHXYH (SEQ ID NO:48) y MYXYF (SEQ ID NO:49) y se sintetizaron los cebadores degenerados correspondientes que codificaban estas secuencias 5'-CAGGATCCTTYTNCATNNNTAYCA-3' (SEQ ID NO:50) (con sentido) o complementarios a estas secuencias 5'-GATCTAGARAARTARTANNRTACAT-3' (SEQ ID NO:51) (antisentido). Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 20µL con 20pmoles de cada cebador, 200ng de ADN genómico de *Heterocapsa sp.* y ADN polimerasa Hotstar Taq (Qiagen) con componentes de tampón y nucleótidos como se especifica por el proveedor. Las reacciones se ciclaron como sigue: 1 ciclo de 95 °C durante 15 minutos, 5 ciclos de 95 °C, 1min, 38 °C, 1min, 72 °C, 1min, 35 ciclos de 95 °C, 35 seg, 52 °C, 30 seg, 72 °C, 1min, 1 ciclo de 72 °C, 10min. Se generaron fragmentos de aproximadamente 50 350pb y se ligaron en pGEM-Teasy para análisis de secuencia.

De los ocho clones aislados, dos clones idénticos tenían secuencias de nucleótidos y aminoácidos codificados con similitud con regiones de elongasas conocidas. Éstos se designaron Het350Elo, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se proporcionan como SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:80 respectivamente. El análisis BLAST y la presencia de un codón de parada en marco sugirió la presencia de un intrón entre aproximadamente las posiciones 33 y 211.

60 Las mejores concordancias con la secuencia de aminoácidos fueron secuencias de elongasa de animales, véase por ejemplo Meyer et al. (2004), indicando que la secuencia de gen de *Heterocapsa* aislado estaba implicada probablemente en la elongación de sustratos ácido graso C 18 y C20.

Los clones de longitud completa de la elongasa pueden aislarse fácilmente por cribado de una biblioteca de ADNc de *Heterocapsa* o por técnicas RACE 5'- y 3', muy conocidas en la técnica.

65 Construcción de una biblioteca de ADNc de *Melosira sp.* y secuenciación de EST

El ARNm, para la construcción de una biblioteca de ADNc, se aisló de células de *Melosira* sp. usando el método siguiente. Se convirtieron en polvo 2 g (peso húmedo) de células de *Melosira* sp. usando un mortero y pilón en nitrógeno líquido y se esparció lentamente en un vaso de precipitados que contenía 22 ml de tampón de extracción que se agitaba constantemente. A esto, se añadieron 5 % polivinilpirrolidona insoluble, 90mM 2-mercaptoetanol, y 10mM ditioteitol y la mezcla se agitó durante 10 minutos más antes de ser transferida a un tubo Corex™. Se añadieron 18,4 ml de 3M acetato de amonio y se mezcló bien. La muestra se centrifugó a 6.000xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el ácido nucleico se precipitó por la adición de 0,1 volumen de 3M NaAc (pH 5,2) y 0,5 volúmenes de isopropanol frío. Después de 1 hora de incubación a -20 °C, la muestra se centrifugó a 6.000xg durante 30 minutos en un rotor oscilante. El sedimento se resuspendió en 1 ml de agua y se extrajo con fenol/cloroformo. La capa acuosa se transfirió a un tubo nuevo y los ácidos nucleicos se precipitaron otra vez por la adición de 0,1 volumen 3M NaAc (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol enfriado en hielo. El sedimento se resuspendió en agua, se determinó la concentración de ácido nucleico y el ARNm se aisló usando el sistema Oligotex mRNA (Qiagen).

Se sintetizó ADNc de primera cadena usando un conector-cebador oligo(dT) suministrado por el kit de síntesis ZAP-cDNA (Stratagene - cat # 200400) y la transcriptasa inversa SuperscriptIII (Invitrogen). El ADNc de doble cadena se ligó a adaptadores *EcoRI* y a partir de esto se construyó una biblioteca usando el kit de síntesis ZAP-cDNA descrito en el manual de instrucciones adjunto (Stratagene - cat # 200400). Se obtuvo una biblioteca primaria de $1,4 \times 10^6$ unidades formadoras de placa (pfu). El tamaño medio del inserto de los insertos de ADNc en la biblioteca fue 0,9 kilobases tomando como base 47 placas aleatorias y el porcentaje de recombinantes en la biblioteca fue 99 %.

Se realizó una secuenciación de nucleótidos de único paso de 8.684 etiquetas de secuencia expresada (ESTs) con el cebador SK (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3') (SEQ ID NO:87) usando el sistema ABI BigDye. Las secuencias de 6.750 EST fueron más largas de 400 nucleótidos, mostrando que los insertos tenían al menos ese tamaño. Se identificaron EST que mostraban homología con varias ácido graso desaturasas y una PUFA elongasa por análisis BlastX.

La secuencia de aminoácidos (parcial) (SEQ ID NO:88) codificada por el clon de ADNc Mm301461 mostró 75 % de identidad con la ácido graso elongasa 1 de *Thalassiosira pseudonana* (No. de Registro AY591337). La secuencia de nucleótidos del clon EST Mm301461 se proporciona como SEQ ID NO:89. El alto grado de identidad de una elongasa conocida hace que sea muy probable que Mm301461 codifique una ácido graso elongasa de *Melosira*. Las técnicas RACE pueden utilizarse fácilmente para aislar el clon de longitud completa que codifica la elongasa.

Ejemplo 13. Aislamiento de fragmento génico de elongasa semejante a FAE de *P. salina*

Se secuenciaron clones de ADNc aleatorios de la biblioteca de ADNc de *P. salina* por una estrategia EST. En una ronda inicial de secuenciación, se secuenciaron 73 clones. Un clon, designado 11.B1, se identificó como que codificaba una proteína (secuencia parcial) que tenían similitud de secuencia con ácido graso elongasas semejantes a beta ceto-acil sintasa conocida, tomando como base un análisis BLASTX. La secuencia de nucleótidos de 11.B1 desde el extremo 3' se proporciona como (SEQ ID NO:55).

Estas elongasas de planta son diferentes de la elongasa de la clase ELO en que se sabe que están implicadas en la elongación de ácidos grasos C16 a C18 y también en la elongación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena muy larga. El clon 11.B1, representa el primer gen aislado que no es de planta superior en esta clase.

Ejemplo 14. Aislamiento de un gen que codifica una $\delta 5$ -desaturasa de *P. salina*

Aislamiento de un fragmento génico de un gen de $\Delta 5$ -desaturasa de *P. salina*

Con el fin de aislar un gen de $\Delta 5$ -desaturasa de *P. salina*, se diseñaron oligonucleótidos para una región conservada de desaturasas. Se prepararon oligonucleótidos designados d5A y d5B mostrados más adelante correspondientes a una secuencia corta de ADN de un gen de $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova lutheri*. Oligo d5A: 5'-TGGGTTGAGTACTCGGCCAACACACGACCAACTGCGCGCCCTCGTGGTGGT GCGACTGGTGGATGTCTTACCTCAACTACCAGATCGAGCATCATCTGT-3' (nucleótidos 115-214 de la solicitud de patente internacional publicada como WO03078639-A2, Figura 4a) (SEQ ID NO:56) y oligo d5B: 5'-ATAGTGCAGCCCGTGCTTCTCGAAGAGCGCCTTGACGCGGGCGCGATCGTC GGGTGGCGGAATTGCGGCATGGACGGGAACAGATGATGCTCGATCTGG-3' (correspondiente al complemento de los nucleótidos 195-294 de WO03078639-A2, Figura 4a) (SEQ ID NO:57). Estos oligonucleótidos se hibridaron y extendieron en una reacción de PCR. El producto de PCR se insertó en el vector pGEM-T Easy y se confirmó la secuencia de nucleótidos.

El fragmento clonado se marcó y se usó como una sonda de hibridación para el cribado de una biblioteca de ADNc de *Pavlova salina* en condiciones de astringencia moderadamente altas, hibridando a 55 °C toda la noche con una solución de hibridación SSC y lavando las transferencias a 60 °C con 2x SSC/0,1 % SDS tres veces cada una durante 10 minutos. A partir del cribado de aproximadamente 500.000 placas, se aislaron 60 placas que

proporcionaron al menos una señal débil de hibridación. Entre 13 clones que se secuenciaron, un clon designado p1918 contenía un ADNc de longitud parcial que codificaba una secuencia de aminoácidos con homología con genes de $\Delta 5$ -desaturasa conocidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos era 53 % idéntica a los residuos de aminoácidos 210-430 de la región C-terminal de un gen de $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium* (No. de Registro AF489588).

Aislamiento de un de $\Delta 5$ -desaturasa de longitud completa

La secuencia de longitud parcial en p1918 se usó para diseñar una pareja de cebadores específicos de secuencia, que se usaron en cribado por PCR de las 60 placas aisladas mencionadas anteriormente. Diecinueve de las 60 fueron positivas, teniendo la misma secuencia de ADNc o similar. Uno de los clones que mostró una señal fuerte de hibridación usando la secuencia de longitud parcial como una sonda se usó para determinar la secuencia de longitud completa proporcionada como SEQ ID NO:58, y la secuencia de aminoácidos (longitud de 425 aminoácidos) codificada por ésta se proporciona como SEQ ID NO:60.

La secuencia de aminoácidos se usó para buscar en la base de datos de secuencia de proteína NCBI usando el software BLASTX. Los resultados indicaron que esta secuencia era homóloga a $\Delta 5$ -desaturasas conocidas. La secuencia de aminoácidos de la proteína de *P. salina* mostró 81 % de identidad con una secuencia de *P. lutheri* de actividad indefinida en WO03/078639-A2, y 50 % de identidad con una $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrium* (No. de Registro AF489588). La $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina* mostró todos los restos conservados típicos de 'desaturasas de extremo frontal' incluyendo el dominio semejante a citocromo b_5 N-terminal y tres restos ricos en histidina conservados.

Co-expresión de los genes de $\Delta 9$ elongasa, $\Delta 8$ -desaturasa y $\Delta 5$ -desaturasa en células transformadas (comparativo)

La co-expresión del gen de $\Delta 5$ -desaturasa junto con el gen de $\Delta 9$ elongasa (Elo2, Ejemplo 7) y el gen de $\Delta 8$ -desaturasa (Ejemplo 6) se consiguió en células como sigue. Se construyó el vector de expresión de planta pXZP354 que contenía los tres genes, cada uno de *P. salina*, y cada uno expresado a partir del promotor napin específico de semilla. La región codificadora de $\Delta 8$ -desaturasa de *P. salina* del clon de ADNc (anterior) se insertó en primer lugar como un fragmento *Bam*HI-*Nco*I en pXZP143 entre el promotor napin específico de semilla y el terminador *Nos*, resultando en el plásmido pXZP146. El gen de $\Delta 9$ -elongasa de *P. salina* se insertó asimismo, como un fragmento *Pst*I-*Xho*I a partir de su clon de ADNc, en pXZP143 resultando en el plásmido pXZP143-Elo2. El gen de $\Delta 5$ -desaturasa de *P. salina* también se insertó, como un fragmento *Pst*I-*Bss*HI a partir de su clon de ADNc, en pXZP143, resultando en el plásmido pXZP147. Después, el fragmento *Hind*III-*Ap*I que contenía el casete de expresión de $\Delta 9$ -elongasa de pXZP143-Elo2 se insertó en pXZP146 aguas abajo del casete de expresión de $\Delta 8$ -desaturasa, resultando en el plásmido pXZP148. El fragmento *Hind*III-*Ap*I que contenía el casete de expresión de $\Delta 5$ -desaturasa de pXZP147 se insertó en pXZP148 aguas abajo de los casetes de expresión de $\Delta 8$ -desaturasa y $\Delta 9$ -elongasa, resultando en el plásmido pXZP149. Después, como una etapa final, el fragmento *Hind*III-*Ap*I que contenía los tres genes de pXZP149 se insertó en un derivado del vector binario pART27, que contenía un marcador de selección de gen de resistencia a higromicina, resultando en el plásmido de expresión de planta pXZP354.

El plásmido pXZP354 se introdujo en *Arabidopsis* por el método de inmersión floral mediado por *Agrobacterium*, bien en la presencia simultánea o la ausencia del plásmido de expresión pXZP355 (Ejemplo 11) que contenía los genes de $\Delta 5$ -elongasa y $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*. La co-transformación de los vectores pudo conseguirse ya que contenían genes marcadores seleccionables diferentes. En el último caso, las plantas transgénicas (designadas plantas "DR") se seleccionaron usando higromicina como agente selectivo, mientras en el primer caso, las plantas (plantas "DU") se seleccionaron tanto con higromicina como kanamicina.

Se obtuvieron veintiuna plantas DR (plantas T1). El análisis de los ácidos grasos del aceite de la semilla de semillas T2 de diez de estas plantas mostró la presencia de niveles bajos de 20:2 ω (EDA), 20:3 ω 6 (DGLA) y 20:4 ω 6 (ARA), incluyendo hasta 0,4 % ARA. El análisis de ácidos grasos del aceite de semillas de semillas T2 de siete plantas DU mostró niveles similares de estos ácidos grasos. A partir de las proporciones relativas de estos ácidos grasos, se concluyó que los genes de $\Delta 5$ -desaturasa y $\Delta 8$ -desaturasa estaban funcionando eficientemente en semillas transformadas con pXZP354 pero que la actividad del gen de $\Delta 9$ elongasa era subóptima. Es probable que el acortamiento de la región codificadora en el extremo N-terminal, para iniciar la traducción en la posición de aminoácidos 11 o 29 de SEQ ID NO:3 (Ejemplo 9) (véase SEQ ID NO's 85 y 86) mejorará el nivel de actividad del gen de $\Delta 9$ elongasa. La expresión de uno o dos de los genes de promotores específicos de semilla distintos del promotor napin, de manera que no todos se expresan a partir del promotor napin, también se espera que mejore el nivel de expresión del gen de $\Delta 9$ elongasa.

Ejemplo 15. Aislamiento de un gen que codifica una $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium plantagineum*

Algunas especies de plantas tales como onagra común (*Oenothera biennis*), borraja común (*Borago officinalis*), grosella negra (*Ribes nigrum*), y algunas especies de *Echium* que pertenecen a la familia *Boraginaceae* contienen los ácidos grasos C18 ω 6- y ω 3-desaturados, ácido γ -linolénico (18:3 ω 6, GLA) y ácido estearidónico (18:4 ω 3, SDA) en los lípidos de sus hojas y TAG de semillas (Guil-Guerrero et al., 2000). GLA y SDA son reconocidos como ácidos

grasos beneficiosos en la nutrición humana. La primera etapa en la síntesis de LC-PUFA es una $\Delta 6$ -desaturación. GLA se sintetiza por una $\Delta 6$ -desaturasa que introduce un enlace doble en la posición $\Delta 6$ de LA. La misma enzima también es capaz de introducir un enlace doble en la posición $\Delta 6$ de ALA, produciendo SDA. Los genes de $\Delta 6$ -desaturasa se han clonado a partir de miembros de *Boraginaceae*, como borraja (Sayanova et al., 1997) y dos especies de *Echium* (García-Maroto et al., 2002).

Echium plantagineum es una nativa invernal anual de la Europa Mediterránea y África del Norte. Su aceite de semilla no es habitual ya que tiene una proporción única de ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ y contiene grandes cantidades de GLA (9,2 %) y SDA (12,9 %) (Guil-Guerrero et al., 2000), lo que sugiere la presencia de actividad $\Delta 6$ -desaturasa implicada en la desaturación de ácidos grasos tanto $\omega 3$ como $\omega 6$ en las semillas de esta planta.

Clonación del gen *EplD6Des* de *E. plantagineum*

Se usaron cebadores degenerados con sitios de restricción *Xba*I o *Sac*I integrados correspondientes a las secuencias de aminoácidos N- y C-terminal MANAIKKY (SEQ ID NO: 61) y EALNTHG (SEQ ID NO: 62) de $\Delta 6$ -desaturasas conocidas de *Echium pitardii* y *Echium gentianoides* (García-Maroto et al., 2002) para la amplificación por RT-PCR de secuencias de $\Delta 6$ -desaturasa de *E. plantagineum* usando una ADN polimerasa correctora de errores Pfu Turbo® (Stratagene). El producto de amplificación de PCR de 1,35kb se insertó en pBluescript SK(+) en los sitios *Xba*I y *Sac*I para generar el plásmido pXZP106. Se determinó la secuencia de nucleótidos del inserto (SEQ ID NO:63). Comprendía un marco de lectura abierto que codificaba un polipéptido de 438 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO:64) que tenía un alto grado de homología con otras $\Delta 6$ - y $\Delta 8$ -desaturasas señaladas de *E. gentianoides* (SEQ ID NO:65), *E. pitardii* (SEQ ID NO:66), *Borago officinalis* (SEQ ID NO:67 y 68), *Helianthus annuus* (SEQ ID NO:69) y *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:71) (Figura 10). Tiene un dominio citocromo b_5 en el extremo N, incluyendo el resto HPGG (SEQ ID NO:72) en la región de unión hemo, como se ha informado para otras $\Delta 6$ - y $\Delta 8$ -desaturasas (Sayanova et al. 1997; Napier et al. 1999). Además, la $\Delta 6$ desaturasa de *E. plantagineum* contiene tres cajas de histidina conservadas, incluyendo la tercera caja de histidina que contiene la firma de resto QXXHH (SEQ ID NO:73) presente en la mayoría de las desaturasas 'de extremo frontal' (Figura 10) (Napier et al., 1999). El análisis de grupos incluyendo miembros representativos de $\Delta 6$ y $\Delta 8$ desaturasas mostró un agrupamiento claro del gen clonado con otras $\Delta 6$ desaturasas especialmente las de especies de *Echium*.

Expresión heteróloga del gen de $\Delta 6$ -desaturasa de *E. plantagineum* en levadura

Los experimentos de expresión en levadura se llevaron a cabo para confirmar que el gen clonado de *E. plantagineum* codificaba una enzima $\Delta 6$ -desaturasa. El fragmento génico se insertó como un fragmento *Xba*I-*Sac*I en los sitios *Sma*I-*Sac*I del vector de expresión de levadura pSOS (Stratagene) que contiene el promotor constitutivo *ADH1*, resultando en el plásmido pXZP271. Éste se transformó en la cepa de levadura S288C α por un método de choque con calor y las colonias transformantes se seleccionaron plaqueando en placas con medio mínimo. Para el análisis de la actividad enzimática, se crecieron 2mL de cultivos clonales de levadura hasta una D.O.₆₀₀ de 1,0 en medio mínimo de levadura en presencia de 0,1 % NP-40 a 30 °C con agitación. Los ácidos grasos precursores libres, bien ácido linoleico o linolénico como preparaciones madre 25mM en etanol, se añadieron de manera que la concentración final de ácido graso fue 0,5mM. Los cultivos se transfirieron a 20 °C y se crecieron durante 2-3 días con agitación. Las células de levadura se recogieron por centrifugación repetida y se lavaron en primer lugar con 0,1 % NP-40, después 0,05 %NP-40 y finalmente con agua. Los ácidos grasos se extrajeron y se analizaron. Las identidades de los picos de ácidos grasos se confirmaron por GC-MS.

Las células de levadura transgénicas que expresan el *EplD6Des* de *Echium* fueron capaces de convertir LA y ALA en GLA y SDA, respectivamente. Aproximadamente 2,9 % de LA se convirtió en GLA y 2,3 % de ALA se convirtió en SDA, confirmando la actividad $\Delta 6$ -desaturasa codificada por el gen clonado.

Expresión funcional del gen de $\Delta 6$ -desaturasa de *E. plantagineum* en tabaco transgénico

Con el fin de demostrar que el gen *EplD6Des* podría conferir la síntesis de ácidos grasos $\Delta 6$ desaturados en plantas transgénicas, el gen se expresó en plantas de tabaco. Para hacer esto, el fragmento génico se escindió de pXZP106 como un fragmento *Xba*I-*Sac*I y se clonó en el vector de expresión de planta pB1121 (Clonetech) en los sitios *Xba*I y *Sac*I bajo el control de un promotor constitutivo 35S CaMV, para generar el plásmido de expresión de planta pXZP341. Éste se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, y se usó para la transformación de tejido de planta de tabaco W38, por selección con kanamicina.

El análisis de hibridación por transferencia Northern de plantas transformadas se llevó a cabo para detectar la expresión del gen introducido, y los ácidos grasos totales presentes en los lípidos de las hojas de tabaco W38 de tipo silvestre y plantas de tabaco transformadas se analizó como se ha descrito anteriormente. Las plantas no transformadas contenían cantidades apreciables de LA (21 % de ácidos grasos totales) y ALA (37 % de ácidos grasos totales) en los lípidos de las hojas. Como se esperaba, no se detectó GLA ni SDA, productos de $\Delta 6$ -desaturación, en la hoja no transformada. Además, las plantas de tabaco transgénicas transformadas con el vector pB1121 tenían una composición similar de ácidos grasos en las hojas que las plantas W38 no transformadas. Por el contrario, las hojas de plantas de tabaco transformadas que expresaban el gen *EplD6Des* mostraron la presencia de

picos adicionales con tiempos de retención correspondientes a GLA y SDA. La identidad de los picos de GLA y SDA se confirmó por GC-MS. De forma importante, los ácidos grasos de las hojas de las plantas que expresaban el gen *EplD6Des* contenían de forma consistente aproximadamente una concentración dos veces mayor de GLA que de SDA incluso cuando los ácidos grasos $\Delta 6$ -desaturados totales representaban hasta 30 % de los ácidos grasos totales en los lípidos de sus hojas (Tabla 11).

TABLA 11. Composición de ácidos grasos en lípidos de hojas de tabaco transgénico (%).

Planta	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	SDA	Productos $\Delta 6$ -desaturados totales
W38	21,78	5,50	2,44	21,21	-	37,62	-	-
ET27-1	20,33	1,98	1,25	10,23	10,22	41,10	6,35	16,57
ET27-2	18,03	1,79	1,58	14,42	1,47	53,85	0,48	1,95
ET27-4	19,87	1,90	1,35	7,60	20,68	29,38	9,38	30,07
ET27-5	15,43	2,38	3,24	11,00	0,84	49,60	0,51	1,35
ET27-6	19,85	2,05	1,35	11,12	4,54	50,45	2,19	6,73
ET27-8	19,87	2,86	2,55	11,71	17,02	27,76	7,76	24,78
ET27-11	17,78	3,40	2,24	12,62	1,11	51,56	0,21	1,32
ET27-12	16,84	2,16	1,75	13,49	2,71	50,80	1,15	3,86

El análisis Northern de múltiples líneas de tabaco transgénico independientes mostró niveles variables del transcrito *EplD6Des* que generalmente se correlacionaban con los niveles de productos $\Delta 6$ -desaturados sintetizados en las plantas. Por ejemplo, la planta transgénica ET27-2 que contenía niveles bajos del transcrito *EplD6Des* sintetizó solo 1,95 % de los lípidos totales de sus hojas como ácidos grasos $\Delta 6$ -desaturados. Por otra parte, la planta transgénica ET27-4 contenía niveles significativamente mayores del transcrito *EplD6Des* y también tenía una proporción mucho mayor (30 %) de ácidos grasos $\Delta 6$ -desaturados en los lípidos de sus hojas.

El análisis de las plantas de tabaco individuales mostró que, sin excepción, GLA estaba presente a una concentración mayor que SDA aunque una concentración mayor de ALA que de LA estaba presente en las plantas no transformadas. Por el contrario, la expresión de *EplD6Des* en levadura había resultado en niveles aproximadamente equivalentes de conversión de LA en GLA y ALA en SDA. Las semillas de *Echium plantagineum*, por otra parte, contienen niveles mayores de SDA que de GLA. *EplD6Des* lleva a cabo probablemente su desaturación *in vivo* en las semillas de *Echium plantagineum* sobre LA y ALA esterificados a fosfatidilcolina (PC) (Jones y Harwood 1980). En el ensayo en hojas de tabaco, la enzima lo más probablemente desatura LA y ALA esterificados al lípido monogalactosildiacilglicerol (MGDG) del cloroplasto (Browse y Slack, 1981). En el ensayo de levadura, los precursores de ácidos grasos libres LA y ALA añadidos al medio lo más probablemente entran en el combinado de acil-CoA y están disponibles para que actúe sobre ellos *EplD6Des* en esta forma.

Expresión funcional del gen de $\Delta 6$ -desaturasa de *E. plantagineum* en semillas transgénicas

Para mostrar la expresión específica de semillas del gen $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium*, la región codificadora se insertó en el casete de expresión específico de semillas como sigue. Un fragmento *NcoI-SacI* incluyendo la región codificadora de $\Delta 6$ -desaturasa se insertó en pXZP6, un derivado de pBluescriptSK que contiene un terminador *Nos*, resultando en el plásmido pXZP157. El fragmento *SmaI-ApaI* que contiene la región codificadora y el terminador *EplD6Des-NosT* se clonó en pWVec8-Fp1 aguas abajo del promotor *Fp1*, resultando en el plásmido pXZP345. El plásmido pXZP345 se usó para transformar plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre, ecotipo Columbia, y las plantas transgénicas se seleccionaron por selección con higromicina B. Las plantas transgénicas transformadas con este gen se designaron plantas "DP".

El análisis de la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de semillas T2 de once plantas T1 transformadas con la construcción mostró la presencia de GLA y SDA en todas las líneas, con niveles de productos de $\Delta 6$ -desaturación alcanzando al menos 11 % (Tabla 12). Esto demostró la $\Delta 6$ -desaturación eficiente de LA y ALA en la semilla.

TABLA 12. Composición de ácidos grasos en semillas de *Arabidopsis* transgénica que expresan $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium*.

Planta	Ácido graso (%)								Productos de $\Delta 6$ -desaturación totales (%)	
	16:0	18:0	18:1 ^{$\Delta 9$}	18:2 ^{$\Delta 9,12$}	18:3 ^{$\Delta 6,9,12$}	18:3 ^{$\Delta 9,12,15$}	18:4 ^{$\Delta 6,9,12,15$}	20:0		
Columbia										
DP-2	8,0	2,8	22,9	27,3	2,5	11,3	0,7	1,6	15,8	3,2

DP-3	7,8	2,7	20,6	25,9	3,0	12,1	0,8	1,7	17,8	3,8
DP-4	7,8	2,8	20,4	28,5	1,2	13,7	0,4	1,7	16,1	1,5
DP-5	8,2	3,2	17,4	29,3	1,2	14,2	0,3	2,1	15,6	1,6
DP-7	8,2	2,9	18,4	26,7	5,0	12,7	1,4	1,7	15,2	6,4
DP-11	9,0	3,5	17,8	28,4	3,0	13,4	0,9	2,1	13,9	3,8
DP-12	8,6	3,0	18,9	27,8	3,3	12,6	1,0	1,8	15,4	4,3
DP-13	8,7	2,9	14,4	27,3	8,5	13,7	2,6	1,7	12,4	11,1
DP-14	9,3	2,9	14,2	32,3	2,1	15,4	0,7	1,8	12,8	2,8
DP-15	8,2	2,9	17,8	30,1	0,3	15,3	0,2	1,9	15,5	0,5
DP-16	8,0	2,8	19,5	29,2	2,7	13,1	0,8	1,7	14,2	3,5

Ejemplo 16. Mutagénesis del gen *EpID6Des* de *E. platangineum*

5 Para determinar si podría introducirse variabilidad en el gen de $\Delta 6$ -desaturasa y retener aún así la actividad desaturasa, el ADNc de $\Delta 6$ -desaturasa de *E. platangineum* se mutó aleatoriamente por PCR usando Taq polimerasa y cebadores EPD6DesF1 y EPD6DesR1 en presencia de dITP como describen Zhou y Christie (1997). Los productos de PCR se clonaron como fragmentos *Xba*I-*Sac*I en pBluescript SK(+) en los sitios *Xba*I y *Sac*I, y se determinaron las secuencias de clones seleccionados aleatoriamente. Las variantes aleatorias con cambios en residuos de aminoácidos se eligieron para clonar como fragmentos *Xba*I-*Sac*I en pBI121 y las actividades enzimáticas de las proteínas expresadas a partir de estas variantes se caracterizaron en hojas de tabaco transgénico como se ha descrito anteriormente para el gen de tipo silvestre.

15 La Figura 11A representa la actividad de las variantes de secuencia de *EpID6Des* cuando se expresan en plantas de tabaco. Las variantes podrían dividirse en dos clases amplias en términos de su capacidad para llevar a cabo $\Delta 6$ -desaturación. Las mutaciones representadas como diamantes vacíos mostraron reducciones sustanciales en la actividad de $\Delta 6$ -desaturación mientras las mutaciones indicadas como diamantes llenos tuvieron poco o ningún efecto en la actividad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa codificada. La Figura 11B representa el efecto cuantitativo que tuvo una selección de mutaciones en el gen *EpID6Des* en la actividad $\Delta 6$ -desaturasa. Una mutación L14P en el dominio del citocromo b_5 y una mutación S301P entre la caja de histidina II y la caja de histidina III de *EpID6Des* causó reducciones sustanciales en sus actividades $\Delta 6$ -desaturasa, resultando en una reducción de 3 a 5 veces en los ácidos grasos $\Delta 6$ -desaturados totales cuando se compara con la enzima de tipo silvestre en plantas W38. Sorprendentemente, para cada una se retuvo una actividad significativa. Por el contrario, la mayor parte de las variantes examinadas, como se ejemplifica por la mutación S205N, no tuvieron efecto en la actividad de $\Delta 6$ -desaturación del gen *EpID6Des*.

Ejemplo 17. Comparación de desaturasas dependientes de sustrato acil-CoA y acil-PC para la producción de LC-PUFA en células

30 Como se ha descrito anteriormente, la síntesis de LC-PUFA tales como EPA y DHA en células por la ruta convencional de $\Delta 6$ desaturación requiere la acción secuencial de PUFA desaturasas y elongasas, mostrada esquemáticamente en la Figura 12 parte A. Esta ruta convencional opera en algas, musgos, hongos, diatomeas, nematodos y algunos peces de agua dulce (Sayanova y Napier, 2004). Las PUFA desaturasas de algas, hongos, musgos y gusanos son selectivas para la desaturación de ácidos grasos esterificados en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) mientras las PUFA elongasas actúan en ácidos grasos en la forma de sustratos acil-CoA representados en el combinado acil-CoA en el retículo endoplásmico (ER), que está separado fisiológicamente del componente PC del ER. Por lo tanto, las reacciones secuenciales de desaturación y elongación en un sustrato ácido graso requieren que el ácido graso se transfiera entre los combinados de acil-PC y acil-CoA en el ER. Esto requiere aciltransferasas que son capaces de acomodar sustratos LC-PUFA. Este requerimiento de "cambio de sustrato" puede ser responsable de la baja eficiencia observada en intentos de los que se ha informado anteriormente para reconstituir la biosíntesis de LC-PUFA (Beaudoin et al., 2000, Domergue et al., 2003a). La ruta de $\Delta 8$ desaturación alternativa (Figura 12 parte B) presenta la misma desventaja de requerir "cambio de sustrato".

45 Como se describe en el Ejemplo 5, la estrategia de usar una desaturasa de vertebrados que era capaz de desaturar sustratos acil-CoA, proporcionó una producción relativamente eficiente de LC-PUFA en células de planta incluyendo en la semilla. En el Ejemplo 5, la combinación de una $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa de pez cebra, con una $\Delta 6$ elongasa de *C. elegans* tenía la ventaja de que ambas enzimas desaturasa y elongasa tenían actividad en sustratos acil-CoA en el combinado acil-CoA. Esto puede explicar por qué esta estrategia fue más eficiente en la síntesis de LC-PUFA. Para proporcionar una comparación directa de las eficiencias relativas de usar desaturasa dependiente de sustrato acil-CoA comparado con una desaturasa dependiente de sustrato acil-PC, llevamos a cabo el experimento siguiente. Éste comparó el uso de la $\Delta 6$ desaturasa de *Echium* (Ejemplo 15) y la $\Delta 5$ desaturasa de *P. salina* (Ejemplo 14), ambas de las cuales se piensa que usan sustratos acil-PC, con la $\Delta 6/\Delta 5$ desaturasa de pez cebra que usa un sustrato acil-CoA (Ejemplo 5).

Se preparó una construcción que contenía dos desaturasas dependientes de acil-PC, concretamente la $\Delta 6$ desaturasa de *Echium* y la $\Delta 5$ desaturasa de *P. salina*, en combinación con la $\Delta 6$ elongasa de *C. elegans*. El gen de $\Delta 6$ desaturasa de *Echium* en un fragmento *NcoI-SacI* se insertó en pXZP143 (Ejemplo 15) resultando en pXZP192. El gen de $\Delta 6$ elongasa de *C. elegans* (casete de expresión Fp1-CeElo-NosT) en el fragmento *HindIII-ApaI* de pCeloPWVec8 (Ejemplo 5) se insertó en los sitios *StuI-ApaI* de pXZP147 (Ejemplo 14) para preparar pXZP193. El fragmento *HindIII-ApaI* de pXZP193 que contenía ambos genes (Fp1-PsD5Des-NosT y Fp1-CeElo-NosT) se insertó en los sitios *ApaI-StuI* de pXZP192, resultando en el plásmido pXZP194 que contenía los tres casetes de expresión. El fragmento *XbaI-ApaI* de pXZP194 se insertó en un derivado de pWVec8, resultando en pXZP357.

El plásmido pXZP357 se usó para transformar plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre ecotipo Columbia por el método de inmersión floral mediado por *Agrobacterium*, y se obtuvieron seis plantas transgénicas después de selección con higromicina B (20 mg/L). Las plantas T1 transgénicas se designaron plantas "DT". Las plantas transformadas resistentes a higromicina se transfirieron a tierra y se auto-fertilizaron. Las semillas T2 se recogieron y se analizó la composición de ácidos grasos de las semillas de dos líneas, DT1 y DT2. Los ácidos grasos de las semillas de DT1 y DT2 contenían niveles bajos de 18:3 ω 6 y 18:4 ω 4 (0,9 y 0,8 % de GLA, 0,3 % y 0,1 % de SDA, respectivamente, Tabla 13). Además, tanto las semillas DT1 como DT2 también contenían 0,3 % y 0,1 % de 20:4 ω 6 (ARA). Sin embargo, no hubo síntesis aparente del ácido graso ω 3 EPA en ninguna de las líneas de semilla T2, lo que probablemente reflejaba la mayor capacidad de desaturación de la $\Delta 6$ desaturasa de *Echium* sobre el sustrato ω 6 LA comparado con el sustrato ω 3 ALA (Ejemplo 15).

TABLA 13. Composición de ácidos grasos de aceite de semilla de semilla T2 de DT1 y DT2. Los valores de ácidos grasos son % de ácidos grasos totales.

Ácido graso	Control	DT1	DT2
16:0	7,2	6,5	6,5
18:0	2,9	3,6	3,3
18:1 ω 9	20,0	23,2	22,3
18:2 ω 6	27,5	23,6	24,4
18:3 ω 3	15,1	15,4	16,1
20:0	2,2	2,0	1,9
20:1 ω 9/ ω 11	19,9	19,4	19,5
20:1 ω 7	2,2	3,4	3,0
20:2 ω 6	0,1	0,0	0,0
22:1 ω 7	0,0	0,0	0,0
Otros menores	2,8	1,5	1,9
Total	100,0	98,6	98,9
Nuevo ω6-PUFA			
18:3 ω 6	0,0	0,9	0,8
20:3 ω 6	0,0	0,0	0,0
20:4 ω 6	0,0	0,3	0,1
Total	0,0	1,2	0,9
Nuevo ω3-PUFA			
18:4 ω 3	0,0	0,3	0,2
20:4 ω 3	0,0	0,0	0,0
20:5 ω 3	0,0	0,0	0,0
Total	0,0	0,3	0,2
Ácidos grasos totales	100,0	100,0	100,0

Estos datos son claramente contrarios al Ejemplo 5, más arriba, en el que la expresión de la desaturasa dependiente de acil-CoA de pez cebra en combinación con una $\Delta 6$ elongasa resultó en la producción de al menos 1,1 % ARA y 2,3 % EPA en ácidos grasos de semilla T2. Así, parecería que las desaturasas dependientes de acil-PC son menos efectivas que las desaturasas dependientes de acil-CoA para dirigir la síntesis de LC-PUFA en células de planta.

Ejemplo 18. Expresión de los genes LC-PUFA en *Synechococcus* (comparativo)

Synechococcus spp. (Bacterias; Cianobacterias; Chroococcales; especies de *Synechococcus* por ejemplo *Synechococcus elongatus*, también conocido como *Synechocystis* spp.) son bacterias unicelulares, fotosintéticas, marinas o de agua dulce en el orden cianobacteria que utilizan clorofila a en el aparato de recogida de luz. Las especies incluyen productores primarios importantes en el entorno marino. Una característica bioquímica distintiva de *Synechococcus* es la presencia de ficoeritrina, un compuesto fluorescente naranja que puede detectarse a una longitud de onda de excitación de 540 nm, y que puede usarse para identificar *Synechococcus*. Los miembros del grupo marino *synechococcus* están relacionados muy de cerca a nivel del ARNr 16s. Son obligatoriamente marinos y tienen requerimientos elevados de crecimiento para Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺, y Ca²⁺, pero pueden crecerse fácilmente tanto en medio líquido de agua de mar natural y artificial así como en placas (Waterbury et al. 1988). Como tienen una velocidad rápida de crecimiento heterotrófico o autotrófico, contienen precursores de ácidos grasos tales como LA y ALA, y se transforman de una manera relativamente sencilla, son adecuados para estudios funcionales que implican los genes de síntesis de LC-PUFA, o para la producción de LC-PUFA en sistemas de producción de tipo fermentador. Las cepas tales como *Synechococcus* sp. cepa WH8102, PCC7002 (7002, marina), o PCC7942 (agua dulce) pueden crecerse fácilmente y son susceptibles de manipulación bioquímica y genética (Carr, N.G., y N. H. Mann. 1994. The oceanic cyanobacterial picoplankton, p. 27-48. En D. A. Bryant (ed.), the Molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic publishers, Boston). Por ejemplo, *Synechococcus* se ha usado como un sistema de expresión heterólogo para desaturasas (Domergue 2003b).

20 Perfil de ácidos grasos y velocidades de crecimiento de *Synechococcus* 7002 de tipo silvestre

Para mostrar que la cianobacteria *Synechococcus* 7002 era un huésped adecuado para la transformación de genes de la síntesis de ácidos grasos y que este sistema de expresión podría usarse para ensayar rápidamente las funciones y especificidades de los genes de la síntesis de ácidos grasos, se analizó el crecimiento de la cepa de tipo silvestre 7002 en primer lugar a 22 °C, 25 °C y 30 °C y los perfiles de ácidos grasos resultantes se analizaron por cromatografía de gas para crecimiento a 22 °C y 30 °C (Tabla 14).

TABLA 14. Perfiles de ácidos grasos de *Synechococcus* 7002 de tipo silvestre a temperaturas de crecimiento de 22 °C y 30 °C (% de ácido graso total).

Temp	Mirístico	Palmitico	Palmitoleico	Estearico	Oleico	18:1iso	Linoleico	GLA	Linolenico
22 °C	0,79	42,5	10,6	0,92	8,4	1,5	7,5	0,54	27,1
30 °C	0,76	47,1	10,9	0,67	17,0	0,34	20,4		2,9

El crecimiento a 30 °C fue mucho más rápido que a 22 °C, con velocidades intermedias a 25 °C (Figura 13). Se encontró que las células contenían ácidos tanto linoleico (LA, 18:2 ω6) como linolenico (ALA, 18:3 ω3) que podrían usarse como precursores para la síntesis de LC-PUFA. Aunque algo del precursor preferido ALA se produjo a 30 °C, los niveles mayores se obtuvieron a 22 °C. También se realizaron ensayos para determinar si las células podrían crecerse a 30 °C, seguido de la reducción de la temperatura de incubación hasta 22 °C después de haber alcanzado biomasa suficiente, para ver si esto resultaría en un desplazamiento hacia una mayor producción de ácido linolenico (Figura 14). En este experimento, los niveles de ALA obtenidos fueron mayores de 5 %. En experimentos adicionales, se usó 25 °C como la temperatura preferida para la cepa 7002, proporcionando velocidades de crecimiento adecuadas y un perfil de ácido graso precursor adecuado.

40 Estrategia de transformación

Anteriormente se han usado tanto vectores plasmidicos replicativos como vectores de recombinación homólogos no replicativos para transformar varias especies de cianobacterias, incluyendo *Synechococcus* 7002 (Williams y Szalay, 1983; Ikeda et al., 2002; Akiyama et al., 1998a). Los vectores de recombinación pueden preferirse en determinadas aplicaciones, y se han usado para inactivar un gen, en lugar de crear una cepa de expresión.

Se construyó un vector de recombinación que era adecuado para la introducción de uno o más genes de la síntesis de ácidos grasos en el cromosoma de cepas de *Synechococcus* tales como la cepa 7002. Este vector contenía el gen *sul2* de *Synechococcus* 7002 en un núcleo de plásmido pBluescript, que proporcionó un gen de ampicilina como un marcador seleccionable y permitió la replicación bacteriana en especies tales como *E. coli*. El vector se preparó por ingeniería para contener un promotor *plac* de *E. coli* fusionado con un sitio de clonación múltiple aguas abajo, con los dos elementos insertados aproximadamente en el centro del gen *sul2*. El gen *sul2* en *Synechococcus* codifica un sulfato de baja afinidad que no es esencial en condiciones normales de crecimiento. Cualquier gen distinto de *sul2*, preferiblemente un gen no esencial, podría haberse elegido para incorporación en el vector de recombinación.

El gen *sul2* se amplificó a partir del ADN genómico de *Synechococcus* 7002 usando cebadores específicos de gen, tomando como base la secuencia casi idéntica en la cepa PCC6803 (Genbank No. de Registro NC_000911, nucleótidos 2902831 a 2904501) e insertada en el vector pGEM-T. El promotor *plac* de pBluescript se amplificó usando los cebadores 5'-gctacgcccgggtagctcgcaggctggcgcaacgcaattaatgtga-3' (SEQ ID NO:81) (con sentido) y 5'-cacaggaacagcttgacatcgattaccggcaattgtacggcgccgctacggatctcctcgcagctcgcgggg tagct-3' (SEQ ID NO:82) (antisentido), que también introdujeron varios sitios de restricción en los extremos de la secuencia promotora. El

fragmento amplificado se digirió con *SmaI* y se ligó al fragmento grande *PvuII* de pBluescript incluyendo el gen de beta-lactamasa. Este vector intermedio se digirió con *EcoRV* y *SacI* y se ligó en el fragmento *HpaI* a *SacI* (designado sul2b) del gen sul2. El plásmido resultante se digirió con *BamHI*, se trató con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) para rellenar los extremos, y se ligó al fragmento *SmaI* a *HpaI* (designado sul2a) del gen sul2. Los sitios de restricción en exceso se eliminaron de este vector por digestión con *SacI* y *SpeI*, haciendo romos los extremos con ADN polimerasa T4, y religación. Finalmente, se introdujo un sitio de clonación múltiple aguas abajo del promotor plac digiriendo el vector con *Clal* y *NotI*, y ligando en un fragmento *Clal* a *NotI* de pBluescript, generando el vector de recombinación que se designó pJRP3.2.

Varios genes relacionados con la síntesis de LC-PUFA se adaptaron por métodos de PCR para incluir sitios de restricción flanqueantes así como secuencias de sitio de unión a ribosoma (RBS) que eran adecuados para la expresión en el procarionta, *Synechococcus*. Por ejemplo, la $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium plantagineum* (Ejemplo 15) se amplificó con los cebadores 5'-AGCACATCGATGAAGGAGATATACCCatggctaagcaatcaagaa-3' (SEQ ID NO:83) (con sentido) y 5'-ACGATGCGGCCGCTCAACCATGAGTATTAAGAGCTT-3' (SEQ ID NO:84) (antisentido).

El producto amplificado se digirió con *Clal* y *NotI* y se clonó en los sitios *Clal* a *NotI* de pJRP3.2. Se insertó un gen marcador seleccionable que comprendía una región codificadora de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (gen catB3, No. de Registro AAC53634) aguas abajo de un promotor pbsA (psbA-CAT) en el sitio *XhoI* de pJRP3.2, produciendo el vector pJRP3.3. El gen del marcador seleccionable se insertó en el gen sulB para permitir la selección fácil para eventos de recombinación homóloga después de la introducción del vector de recombinación en *Synechococcus*.

La transformación de *Synechococcus* 7002 se consiguió mezclando el ADN del vector con células durante la fase exponencial de crecimiento, durante la cual ocurría la captación de ADN, como sigue. Aproximadamente 1 μ g del ADN del vector de recombinación resuspendido en 100 μ L de 10 mM Tris-HCl se añadió a 900 μ L de células en fase semi logarítmica creciendo en caldo BG-11. Las células se incubaron durante 90 min a 30 °C e intensidad de luz de 20 μ moles fotones. $m^{-2}.s^{-1}$. Se añadieron alícuotas de 250 μ L a 2 mL de caldo BG-11, se mezcló con 2 mL de agar fundido (1,5 %) y se vertió en placas de agar BG-11 que contenían 50 μ g/mL de cloranfenicol (Cm) para la selección de células recombinantes. Las placas se incubaron durante 10-14 días en las mismas condiciones de temperatura/luz antes de que las colonias resistentes a Cm fueran claramente visibles. Estas colonias se volvieron a sembrar en estrías varias veces en placas frescas de BG-11/Cm50. Después de varias rondas de siembra en estrías en placas selectivas, se inoculó medio líquido con colonias individuales y los cultivos se incubaron a 25 °C

Las células de *Synechococcus* 7002 que contenían el gen de $\Delta 6$ -desaturasa de *Echium* insertado en el gen sulB mediante el vector de recombinación y expresado a partir del promotor plac se muestra que producen GLA (18:3 $\Delta 6,9,12$) y SDA (18:4, $\Delta 6,9,12,15$) a partir de ácido linoleico (LA) y ácido linolénico (ALA) endógenos, respectivamente, como sustratos.

También pueden usarse vectores episomales en *Synechococcus* en lugar de los vectores integrativos/de recombinación descritos anteriormente. Las especies de *Synechococcus* tienen plásmidos nativos que se han adaptado para uso en transformación, por ejemplo pAQ-EX1, en el que un fragmento del plásmido nativo pAQ1 (No. de Registro NC_005025) se fusionó con un plásmido de *E. coli* para formar un vector lanzadera con ambos orígenes de replicación de *E. coli* y *Synechococcus* (Ikeda et al., 2002; Akiyama et al., 1998b).

Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o semejantes que se ha incluido en la presente especificación es solamente para el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que cualquiera o todas estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención al existir antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

REFERENCIAS

- Abbadi, A. et al., (2001) Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 103:106-113.
 Abbadi, A., et al. (2004) Plant Cell 16:2734-2748.
 Abbott et al., (1998) Science 282:2012-2018.
 Agaba, M. et al., (2004) Marine Biotechnol (NY) 6:251-261.
 Akiyama, H. et al. (1998a) DNA Res. 5:327-334.
 Akiyama, H. et al. (1998b) DNA Res. 5:127-129.
 Baumlein, H. et al., (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
 Baumlein, H. et al., (1992) Plant J. 2:233-239.
 Beaudoin, F. et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 97:6421-6426.
 Berberich, T. et al., (1998) Plant Mol. Biol. 36:297-306.
 Bolch, C.J. et al., (1999a) J. Phycology 35:339-355.
 Bolch, C.J. et al., (1999b) J. Phycology 35:356-367.
 Broun, P. et al., (1998) Plant J. 13:201-210.
 Brown, M.R. et al., (1997) Aquaculture 151:315-331.

- Browse, J.A. and Slack, C.R. (1981) *FEBS Letters* 131:111-114.
- Chinain, M. et al., (1997) *J. Phycology* 33:36-43.
- Cho, H.P. et al., (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho, H.P. et al., (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
- 5 Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) *Plant J.* 16:735-43.
- Coleman, A.W. (1977) *Am. J. Bot.* 64:361-368.
- Domergue, F. et al., (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Domergue, F. et al., (2003a) *J. Biol. Chem.* 278:35115-35126.
- Domergue, F. et al., (2003b) *Plant Physiol.* 131:1648-1660.
- 10 Drexler, H. et al., (2003) *J. Plant Physiol.* 160:779-802.
- Dunstan, G. A. et al., (1994) *Phytochemistry* 35:155-161.
- Gallagher, J.C. (1980) *J. Phycology* 16:464-474.
- Garcia-Maroto, F. et al., (2002) *Lipids* 37:417-426.
- Girke, T. et al., (1998) *Plant J.* 15:39-48.
- 15 Guil-Guerrero, J.L. et al., (2000). *Phytochemistry* 53:451-456.
- Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) *Nature* 334:585-591.
- Hastings, N. et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
- Hong, H. et al., (2002) *Lipids* 37:863-868.
- Hong, H. et al., (2002a) *Lipids* 37:863-868.
- 20 Horiguchi, G. et al., (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- Huang, Y.S. et al., (1999) *Lipids* 34:649-659.
- Ikeda, K. et al. (2002) *World J. Microbiol. Biotech.* 18:55-56.
- Inagaki, K. et al., (2002) *Biosci Biotechnol Biochem* 66:613-621.
- Jones, A.V. and Harwood, J.L (1980) *Biochem J.* 190:851-854.
- 25 Kajikawa, M. et al., (2004) *Plant Mol Biol* 54:335-52.
- Knutzon, D.S. et al., (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
- Lee, M. et al., (1998) *Science* 280:915-918.
- Leonard, A.E. et al., (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
- Leonard, A.E. et al., (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
- 30 Leonard, A.E. et al., (2002) *Lipids* 37:733-740.
- Lo, J. et al., (2003) *Genome Res.* 13:455-466.
- Mansour, M.P. et al., (1999a) *J. Phycol.* 35:710-720.
- Medlin, L.K. et al., (1996) *J. Marine Systems* 9:13-31.
- Metz, J.G. et al., (2001) *Science* 293:290-293.
- 35 Meyer, A. et al., (2003) *Biochemistry* 42:9779-9788.
- Meyer, A. et al., (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
- Michaelson, L.V. et al., (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
- Michaelson, L. V. et al., (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
- Mitchell, A.G. and Martin, C.E. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:29766-29772.
- 40 Morita, N. et al., (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 28:872-879.
- Napier, J.A. et al., (1998) *Biochem J.* 330:611-614.
- Napier, J.A et al., (1999) *Trends in Plant Sci* 4:2-4.
- Napier, J.A. et al., (1999) *Curr. Op. Plant Biol.* 2:123-127.
- Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- 45 Parker-Barnes, J.F. et al., (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8284-8289.
- Pereira, S.L. et al., (2004) *Biochem. J.* 378:665-671.
- Perriman, R. et al., (1992) *Gene* 113:157-163.
- Qi, B. et al., (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
- Qiu, X. et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.
- 50 Reddy, A.S. et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.
- Saito, T. et al., (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.
- Sakuradani, E. et al., (1999) *Gene* 238:445-453.
- Sayanova, O.V. et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.
- Sayanova, O.V. et al., (1999) *Plant Physiol.* 121:641-646.
- 55 Sayanova, O.V. et al., (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.
- Sayanova, O.V. y Napier, J.A. (2004) *Phytochemistry* 65:147-158.
- Shippy, R. et al., (1999) *Mol. Biotech.* 12:117-129.
- Simopoulos, A.P. (2000) *Poultry Science* 79:961-970.
- Singh, S. et al., (2001) *Planta* 212:872-879.
- 60 Smith, N.A. et al., (2000) *Nature* 407:319-320.
- Sperling, P. et al., (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
- Sperling, P. and Heinz, E. (2001) *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 103:158-180.
- Sprecher, H. et al., (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
- Spychalla, P.J. et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
- 65 Stalberg, K. et al., (1993) *Plant. Mol. Biol.* 23:671-683.
- Takeyama, H. et al., (1997) *Microbiology* 143:2725-2731.

Tanaka, M. et al., (1999) *Biotechnol. Lett.* 21:939-945.
 Tonon, T. et al., (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
 Trautwein, E.A. (2001) *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103:45-55.
 5 Tvrđik, P. (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.
 Valvekens, D. et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5536-5540.
 Volkman, J.K. et al., (1989) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240.
 Wallis, J.G. y Browse, J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
 Wang, M.B. et al., (1997) *J. Gen. Breed.* 51:325-334.
 Waterbury, J. B. et al. (1988) *Methods Enzymol.* 167:100-105.
 10 Waterhouse, P.M. et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959-13964.
 Watts, J.L. y Browse, J. (1999b) *Arch Biochem Biophys* 362:175-182.
 Williams, J.G. y Szalay, A.A. (1983) *Gene* 24:37-51.
 Whitney, H.M. et al., (2003). *Planta* 217:983-992.
 Yazawa, K. (1996) *Lipids* 31:S297-S300.
 15 Yu, R. et al., (2000) *Lipids* 35:1061-1064.
 Zank, T.K. et al., (2000) *Plant J.* 31:255-268.
 Zank, T.K. et al., (2002) *Plant J.* 31:255-268.
 Zhang, Q. et al., (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.
 20 Zhou, X.R. y Christie, P.J. (1997) *J Bacteriol* 179:5835-5842.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
- 25 <120> Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por células recombinantes
- <130> B07003B - CA/SR
- <140> Desconocido
- 30 <141> 22-04-2005
- <150> US 60/564.627
- <151> 22-04-2004
- 35 <150> US 60/613,861
- <151> 27-09-2004
- <150> AU 2005901673
- 40 <151> 05-04-2005
- <150> US 60/668,705
- <151> 05-04-2005
- 45 <160> 89
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 50 <211> 427
- <212> PRT
- <213> *Pavlova salina*
- <400> 1

ES 2 715 640 T3

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
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

ES 2 715 640 T3

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

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

ES 2 715 640 T3

<210> 2
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 2

Met Lys Ala Ala Ala Gly Lys Val Gln Gln Glu Ala Glu Arg Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Trp Leu Pro Met Met Leu Ala Ala Gly Tyr Leu Leu Val
 20 25 30

Leu Ser Ala Asn Arg Ala Ser Phe Tyr Glu Asn Ile Asn Asn Glu Lys
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Ser Leu Pro Cys Val Met Thr Ala
 50 55 60

Val Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gly Leu Thr Lys Tyr Phe Glu Gly Arg
 65 70 75 80

Lys Pro Met Gln Gly Leu Lys Asp Tyr Met Phe Thr Tyr Asn Leu Tyr
 85 90 95

Gln Val Ile Ile Asn Val Trp Cys Ile Ala Ala Phe Val Val Glu Val
 100 105 110

Arg Arg Ala Gly Met Ser Ala Val Gly Asn Lys Val Asp Leu Gly Pro
 115 120 125

Asn Ser Phe Arg Leu Gly Phe Val Thr Trp Val His Tyr Asn Asn Lys
 130 135 140

Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Leu Trp Met Val Leu Arg Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Gln Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Val Leu Leu Ile Trp
 165 170 175

Ala Trp Phe Cys Val Val Lys Phe Cys Asn Gly Gly Asp Ala Tyr Phe
 180 185 190

Gly Gly Met Leu Asn Ser Ile Ile His Val Met Met Tyr Ser Tyr Tyr
 195 200 205

Thr Met Ala Leu Leu Gly Trp Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Leu Thr
 210 215 220

ES 2 715 640 T3

Gln Ala Gln Leu Val Gln Phe Cys Ile Cys Leu Ala His Ala Thr Trp
225 230 235 240

Ala Ala Ala Thr Gly Val Tyr Pro Phe His Ile Cys Leu Val Glu Ile
245 250 255

Trp Val Met Val Ser Met Leu Tyr Leu Phe Thr Lys Phe Tyr Asn Ser
260 265 270

Ala Tyr Lys Gly Ala Ala Lys Gly Ala Ala Ala Ser Ser Asn Gly Ala
275 280 285

Ala Ala Pro Ser Gly Ala Lys Pro Lys Ser Ile Lys Ala Asn
290 295 300

<210> 3

<211> 304

<212> PRT

<213> *Pavlova salina*

<400> 3

Met Gly Pro Leu Ser Thr Leu Leu Ala Trp Met Pro Thr Trp Gly Glu
1 5 10 15

Phe Val Ala Gly Leu Thr Tyr Val Glu Arg Gln Gln Met Ser Glu Glu
20 25 30

Leu Val Arg Ala Asn Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ile Pro Glu Val Asp
35 40 45

Phe Phe Thr Ile Ala Ser Val Tyr Val Gly Asp His Trp Arg Ile Pro
50 55 60

Phe Thr Ala Ile Ser Ala Tyr Leu Val Leu Ile Thr Leu Gly Pro Gln
65 70 75 80

Leu Met Ala Arg Arg Pro Pro Leu Pro Ile Asn Thr Leu Ala Cys Leu
85 90 95

Trp Asn Phe Ala Leu Ser Leu Phe Ser Phe Val Gly Met Ile Val Thr
100 105 110

Trp Thr Thr Ile Gly Glu Arg Leu Trp Lys Asn Gly Ile Glu Asp Thr
115 120 125

Val Cys Gly His Pro Ile Phe Met Gly Tyr Gly Trp Ile Gly Tyr Val
130 135 140

Met Leu Ala Phe Ile Trp Ser Lys Leu Phe Glu Leu Ile Asp Thr Val
145 150 155 160

Phe Leu Val Ala Lys Lys Ala Asp Val Ile Phe Leu His Trp Tyr His
165 170 175

5

ES 2 715 640 T3

His Val Thr Val Leu Leu Tyr Cys Trp His Ser Tyr Ala Val Arg Ile
 180 185 190

Pro Ser Gly Ile Trp Phe Ala Ala Met Asn Tyr Phe Val His Ala Ile
 195 200 205

Met Tyr Ala Tyr Phe Gly Met Thr Gln Ile Gly Pro Arg Gln Arg Lys
 210 215 220

Leu Val Arg Pro Tyr Ala Arg Leu Ile Thr Thr Phe Gln Leu Ser Gln
 225 230 235 240

Met Gly Val Gly Leu Ala Val Asn Gly Leu Ile Ile Arg Tyr Pro Ser
 245 250 255

Ile Gly His His Cys His Ser Asn Lys Thr Asn Thr Ile Leu Ser Trp
 260 265 270

Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Val Leu Phe Ala Ala Leu Tyr Val Lys
 275 280 285

Asn Tyr Ile Phe Ser Lys Leu Lys Ser Pro Lys Arg Lys Lys Val Glu
 290 295 300

<210> 4
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 4
 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

ES 2 715 640 T3

Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
115 120 125

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
370 375 380

Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Val His His Gly Phe Tyr

ES 2 715 640 T3

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			

5

<210> 5
 <211> 1235
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

<400> 5
 atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcgggtcccg 60
 agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120
 aagcgcgtgg atgtgacaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg 180
 atcttcagg accgcatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcatc 240
 aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc 300
 tcccagtcac cgatgggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360
 tactacgatc catgcccgtc cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc 420
 ttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg 480
 gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctcgcgacag actatctgca ccaactccgtc 540
 ttcaaggggt ccgtcgacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc 600
 ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtgggtg gcgcgcgggc ataacacgca ccacgtgtgc 660
 accaatgagg acggctcggg ccccacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc 720
 aacaagccga gcatcgcaa ggcctgaac gccttcagc gctaccagca gtactactat 780
 gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840
 atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctcgcactcg tcgcgcacta cgccatcgtc 900
 gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgtcgc tgacggttct gcgcgggttt 960
 ggactgga tcaccgtttt cgcgacgac tacggtgagg acattctcga cgcgaccag 1020
 gtgcgtcaca tgacgtcgt cgagcagac gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc 1080
 tggctcgtga acgtgctcac cggcttcatc tcaactgcaga cggagcacca cctgttcccg 1140
 atgatgcaa ccggcaacct catgactatc cagcccaggg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200
 cacggacttg agtaccgca gggcaacctc attga 1235

10

<210> 6
 <211> 1700
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

15

<400> 6

ES 2 715 640 T3

ggcacgaggc agctggccgc cgtcgagaga acgccagggg ggtcatggga cgcggcggag 60
 acagcagtgg gcaggcgcac ccggcgccgg agctggcggt cccgagcgcac cgcgcggagg 120
 tgagcaacgc tgacagcaaa gcgctgcaca tcgtgctgta tggcaagcgc gtggatgtga 180
 ccaagttcca acgcacgcac ccgggtggta gcaaggtctt ccggatcttc caggaccgcg 240
 atgcgacgga gcagttcgag tcctaccact cgaagcgcgc gatcaagatg atggagggca 300
 tgctcaagaa gtctgaggat gctcccgcg acacgccctt gccctcccag tcaccgatgg 360
 ggaaggactt caaggcgatg atcgagcggc acgttgccagc gggttactac gatccatgcc 420
 cgctcgatga gctgttcaag ctcagcctcg tgctcctccc gacctttgcg ggcattgtaca 480
 tgctcaaggc gggcgtcggc tccccgctct gcggcgcctt catggtgagc tttggctggt 540
 acctcgatgg ctggctcgcg caccgactatc tgcaccactc cgtcttcaag gggctccgctg 600
 cacgcaccgt cgggtggaac aacgcggcgg gctacttctt cggcttcgtg caggggatg 660
 cggtcgagtg gtggcgcgcg cggcataaca cgcaccacgt gtgcaccaat gaggacggct 720
 cggaccccga catcaaacg gcgccgctgc tcatatacgt gcgcaacaag ccgagcatcg 780
 ccaagcgcct gaacgccttc cagcgtacc agcagtacta ctatgtgccg gtgatggcaa 840
 tcctcgacct gtactggcgg ctcgagtcga tcgcctacgt cgcgatgcgc ctgccgaaga 900
 tgctgccgca ggccctcgca ctcgtcgcgc actacgccat cgtcgcgtgg gtctttgcg 960
 gcaactacca cctgctcccg ctcgtgacgg ttctgcgcgg gtttggcact gggatcaccg 1020
 ttttcgcgac gactacggt gaggacattc tcgacgcgga ccagggtcgt cacatgacgc 1080
 tcgtcgagca gacggcactc acctcgcgca acatctcggg cggctggctc gtgaacgtgc 1140
 tcaccggctt catctcactg cagacggagc accacctggt cccgatgatg ccaaccggca 1200
 acctcatgac tatccagccc gaggtgcgcg ctttcttcaa gaagcacgga cttgagtacc 1260
 gcgagggcaa cctcattgag tgcgtgcggc agaacatccg tgcgcttgca ttcgagcacc 1320
 tgctttgagc gctctccgct tccaagggcg ggatcggcgc atccgttggt gctgcggcac 1380
 caacgcttcc gctctcgagc gcagatgttg gttgcatcac gcatcacacc cccccccagc 1440
 cggatcacc agctcccgat gcttggcgta cctagccgcg tcctcccagc atgactgca 1500
 actcattcac cacctgctac agtttcggcc taatccatgg cccgactgct tgccgccttg 1560
 cacaccgacg agtacgccga ctcgggtcaa tgcctcggcg taatctgctg gcgtgctgcg 1620
 gcactgtgat tcattcattg atcgcacagt tcacagcatg ttcgctgaca caacgtttgc 1680
 tgacctcata gacagtagaa 1700

<210> 7
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

<400> 7
 atgaaagctg cggcaggcaa ggtgcagcag gaggcggagc gcctcacggc gggcctctgg 60
 ctgccgatga tgcttgccgc cggttatctg ctggttctct ctgcaaaccg cgcgagcttc 120

5

ES 2 715 640 T3

tacgagaaca tcaacaacga gaagggcgcc tactcgcgct cgtggttctc gctgcccgtgc 180
 gtcgatgacgg ctgtgtacct gggcgggtgtg tttggcttga ccaagtactt tgagggtcgc 240
 aagccgatgc agggcctgaa ggattacatg tttacgtaca acctgtacca ggtgatcatc 300
 aacgtgtggt gcatcgcggc tttcgtcgtg gaggtgaggc gcgcgggcat gagcgcgggtg 360
 ggcaacaagg tcgacctcgg ccccaactcc ttcaggctcg gctttgtgac gtgggtgcac 420
 tacaacaaca agtacgtcga gctgctcgac acgctgtgga tgggtgctgcg caagaagacg 480
 cagcaggtct ccttcctgca cgtgtaccac cacgtgctgc tcatctgggc gtggttctgc 540
 gtagtcaaat tctgcaacgg cggcgacgcc tactttggcg gcatgctcaa ctcgatcatc 600
 cacgtgatga tgtactcgta ctacacgatg gcgctgctcg gctggagttg tccatggaag 660
 cgatacctca ctcaggcgca gctcgtgcag ttctgcattt gcctcgcgca cgcgacgtgg 720
 gcggccgcga cgggcgtgta ccccttcac atttgcctcg tcgagatctg ggtgatggtg 780
 tcgatgctgt acctgttcac caagttctac aactctgcgt acaagggcgc agcaaagggc 840
 gcagcagcga gcagcaacgg tgcggcggcg ccgagcggag ccaagcctaa gagcatcaag 900
 gccaaactga 909

<210> 8
 <211> 1216
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 8
 gaattcggca cgaggtcttc ttccagctgt ggtcgtcatg aaagctgcgg caggcaaggt 60
 gcagcaggag gcggagcgcc tcacggcggg cctctggctg ccgatgatgc ttgcggccgg 120
 ttatctgctg gttctctctg caaacgcgc gagcttctac gagaacatca acaacgagaa 180
 gggcgcctac tcgacgtcgt ggttctcgtc gccgtgcgtc atgacggctg tgtacctggg 240
 cgggtgtgtt ggcttgacca agtactttga gggtcgcaag ccgatgcagg gcctgaagga 300
 ttacatgttt acgtacaacc tgtaccaggt gatcatcaac gtgtggtgca tcgcggtctt 360
 cgtcgtggag gtgaggcgcg cgggcatgag cgcgggtggc aacaaggtcg acctcggccc 420
 caactccttc aggctcggct ttgtgacgtg ggtgcactac aacaacaagt acgtcgagct 480
 gctcgacacg ctgtggatgg tgctgcgcaa gaagacgcag caggtctcct tcctgcacgt 540
 gtaccaccac gtgctgctca tctgggcgtg gttctgcgta gtcaaattct gcaacggcgg 600
 cgacgcctac tttggcggca tgctcaactc gatcatccac gtgatgatgt actcgtacta 660
 cacgatggcg ctgctcggct ggagttgtcc atggaagcga tacctcactc aggcgcagct 720
 cgtgcagttc tgcatttgcc tcgcgcacgc gacgtgggcg gccgcgacgg gcgtgtaccc 780
 cttccacatt tgcctcgtcg agatctgggt gatggtgtcg atgctgtacc tgttcaccaa 840
 gttctacaac tctgcgtaca agggcgcagc aaagggcgca gcagcgagca gcaacgggtg 900
 ggcggcggcg agcggagcca agcctaagag catcaaggcc aactgaggcc tggcacgcgg 960
 gcgaggccgc ggcacgccgc gcagttccgg tcggcgcaac gtcgcggctg cgccgcgcta 1020

ES 2 715 640 T3

cgcaccacgc aggcagtggg tcaggtggcg aagtgtgcag cctgtctgtc gcctgcacac 1080
 ccattgattg gtcccgcctg cgctactctg cgcactgcca agtcgccaag acctgtacgt 1140
 gtatgatctg actgataccg catacggatg tcccgtatgc gacgactgcc atacgtgctg 1200
 cacacgttgt ccaacc 1216

5 <210> 9
 <211> 915
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

<400> 9
 atggggccgt tgagcacgct gctagcgtgg atgcccacct ggggcgagtt tgtcgccggg 60
 ctgacctatg tcgagcgcca gcagatgtca gaggagctcg tgcgcgcaaa taagctcccg 120
 ctgtcgctca tcccggaggt ggacttcttc acgatcgcgt cagtctacgt gggcgaccat 180
 tggcggatcc cattcacggc catctcggct tatctggtct tgatcacgct cgggccgcag 240
 ctcatggcca ggcggccgcc attgccaatc aacaccttgg cgtgcctctg gaatttcgcy 300
 ctgtcgctct ttagttttgt cggcatgatt gttacgtgga cgaccatcgg cgagcgcctg 360
 tggaaaaatg gtatcgagga cacagtgtgc ggccatccga tattcatggg gtacggctgg 420
 atcggatatg ttatgcttgc cttcatctgg tcgaagctct tcgagctgat cgacaccgta 480
 ttctcgtcg cgaagaaggc cgacgtcatc ttctgcact ggtaccacca cgtgacggtg 540
 ctgctatact gctggcattc gtacgctggt cgtatcccgt ccggcatctg gtttgccgcy 600
 atgaattatt tcgtacacgc catcatgtac gcctactttg gcatgacaca gattgggccc 660
 aggcagcgcg agctcgtgcy accgtacgca cggctcatca ccacgttcca gctgtcgcag 720
 atgggcgtcg gtctggccgt caatggcctt atcatccgct acccgtcgat aggccatcat 780
 tgccactcga acaagacgaa caccattttg agctggatca tgtacgcgag ctactttgtg 840
 cttttcgccg cactatacgt gaagaactac atcttctcca agctgaagtc gcccaagagg 900
 aagaagggtg aatga 915

10 <210> 10
 <211> 1219
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

15 <400> 10
 gaattcggca cgaggtgcag cttgagcct tacgcaggcc gactcgcgcy tggctagcac 60
 gcagcgcgcc caaccccatg gggccggtga gcacgctgct agcgtggatg cccacctggg 120
 gcgagtttgt cgccgggctg acctatgtcg agcgcagca gatgtcagag gagctcgtgc 180
 gcgcaaataa gctcccgtg tcgctcatcc cggaggtgga cttcttcacg atcgcgctcag 240
 tctacgtggg cgaccattgg cggatcccat tcacggccat ctcggcttat ctggtcttga 300
 tcacgctcgg gccgcagctc atggccaggc ggccgccatt gccaatcaac accttggcgt 360
 gcctctggaa tttcgcgctg tcgctcttta gttttgctcg catgattggt acgtggacga 420

ES 2 715 640 T3

ccatcggcga ggcctgtgg aaaaatggta tcgaggacac agtgtgcggc catccgatat 480
 tcatggggta cggctggatc ggatatgtta tgcttgccctt catctggctg aagctcttcg 540
 agctgatcga caccgtattc ctcgtcgcga agaaggccga cgtcatcttc ctgcaactgg 600
 accaccacgt gacggtgctg ctatactgct ggcattcgta cgctgttcgt atcccgtccg 660
 gcatctgggt tgccgcgatg aattatttcg tacacgccat catgtacgcc tactttggca 720
 tgacacagat tgggcccagg cagcgcaagc tcgtgcgacc gtacgcacgg ctcatcacca 780
 cgttccagct gtcgcagatg ggcgtcggtc tggccgtcaa tggccttatc atccgctacc 840
 cgtcgatagg ccatcattgc cactcgaaca agacgaacac cattttgagc tggatcatgt 900
 acgcgagcta ctttgtgctt ttcgccgcac tatacgtgaa gaactacatc ttctccaagc 960
 tgaagtcgcc caagaggaag aaggtggaat gattgactcg agctcgtggt tccgccatct 1020
 gtcattttac ggctcctcct gatgcggacg gcagctctga tctttgccac aggaccgatg 1080
 acggccgatg gtgtctgggt ccagctggct ctgtcattcg cggctcatgg gcacccgggt 1140
 gggagcacca gctgtcagac cggactcgat gagatagcgg tgacagacgg accgtgacca 1200
 cgagtctcat catctgttg 1219

<210> 11
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 11
 agcacgacgg gaaccacggc ggcctctcca agtcggcctc ggtcaacctg gcgctcgggt 60
 tgtgccagca ctggatcggc gggagcatga tcctctggct gcaggagcac gtgatgatgc 120
 accac 125

10

<210> 12
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

15

<400> 12
 atgcctccga ggcgggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca 60
 gattcgtcgg cttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt 120
 gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg 180
 tcgctgttcg gcgggcgca tgccacggag gcgttcattg agtaccaccg gcgcgccctgg 240
 cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc 300
 gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcacgc ccaagatggt gccgtcggtc 360
 agcagcgggt tcgcccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg 420
 atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgc tgctcccgtc gatcgtgctc 480
 ggggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc 540
 tccaagtcgg cctcgggtcaa cctggcgtc gggttgtgcc aggactggat cggcgggagc 600
 atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgacacacca cgacgttgac 660

ES 2 715 640 T3

aaggacccgg accagaaggc gcacggcgcc ctgcggtca agccgaccga cgcgtggagc 720
 ccgatgcaact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag 780
 ctgctgtttc tcgacatcag cgagctgggt atgtggcggg gggagggcga gcccatcagc 840
 aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc 900
 tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgcc agcgtgcaca cggcgggtgtg catcgcggcg 960
 acggtaatga cggggagctt ctacctgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag 1020
 ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcacacctc 1080
 ctcaagcggc aggccgagac ctcgtccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cacgctcaac 1140
 ggcggcctca actaccaaact cgagcaccac ctcttcccca ggggtcacca cggcttctac 1200
 cctcgcctcg cgccgttggg caaggcggag ctcgagggcg gcggcattga gtacaagcac 1260
 taccaccca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc 1320
 aggccgcgca gcaaggcggg gtga 1344

<210> 13
 <211> 1687
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 13
 ctccctgtgag accgcgttgc gccagcgcga ggaccgacct gcacgcgcga tgcctccgag 60
 cgcggcgaag cagatgggcg cgagcacggg cgtgcatgcg ggcgtcacag attcgtcggc 120
 cttcacgcgc aaggatgtcg ccgacaggcc ggacctcacg atcgtgggtg acagcgtgta 180
 cgatgcgaag gcgttccgct ccgagcatcc ggggtggcgcg cactttgtgt cgctgttcgg 240
 cgggcgcgat gccacggagg cgttcatgga gtaccaccgg cgcgcctggc ccaagtcgcg 300
 catgtcgcgc ttccacgtcg gctctctggc atcgaccgag gagcccgtcg ccgccgatga 360
 gggctacctc cagctgtgcg ctcgcatcgc caagatgggtg ccgtcgggtca gcagcgggtt 420
 cgcgccggcg tcgtactggg tgaaggccgg gctgatcctc ggctccgcga tcgcgctcga 480
 ggcgtacatg ctgtacgcgg gcaagcgcct gctcccgtcg atcgtgctcg ggtggctggt 540
 tgcgctgatt ggcctgaaca tccagcacga tgccaaccac ggcgcgctct ccaagtcggc 600
 ctcgggtcaac ctggcgtcgc ggttgtgcca ggactggatc ggcgggagca tgatcctctg 660
 gctgcaggag cacgttgtca tgcaccactt gcacaccaac gacgttgaca aggacccgga 720
 ccagaaggcg cacggcgccc tgcggctcaa gccgaccgac gcgtggagcc cgatgcaactg 780
 gctgcagcac ctctacctgc tgcctgggga gacgatgtac gccttcaagc tgctgtttct 840
 cgacatcagc gagctgggtga tgtggcgggtg ggagggcgag cccatcagca agctggccgg 900
 gtacctctc atgccctcgc tgctcctcaa gctcaccttc tgggcgcgct ttgtcgcgct 960
 gccgctgtac ctcgcgcca gcgtgcacac ggcgggtgtg atcgcggcga cggtaatgac 1020
 ggggagcttc tacctcgcct tcttcttctt catctcgcac aacttcgagg gcgtggcggag 1080
 cgtcggaccg gacggcagca tcaccagcat gacgcgcggc gcatccttcc tcaagcggca 1140

ES 2 715 640 T3

ggccgagacc tcgtccaacg tgggcggccc gctgctcgcc acgctcaacg gcggcctcaa 1200
ctaccaaadc gagcaccacc tcttccccag ggtgcaccac ggcttctacc ctcgcctcgc 1260
gccgttggtc aaggcggagc tcgagggcgcg cggcattgag tacaagcact accccaccat 1320
atggagcaac ctggcatcca cgctgaggca catgtacgcg ctcggccgca ggccgcgcag 1380
caaggcggag tgacgagcct cccaatcggc tgcccaggct gctggcagct tgggtcgacc 1440
atcggcatcg actcggcgac gccgacgcca gccgtggtcg cacaaacggc tcggcgttgg 1500
ttcttcggct accgcgccgg aaccggggca cgcacctgac tcggtgacga ttgcggctcg 1560
accagcagaa gcgctcacc cgcccccgc tcggatcggg cggcatagag catacatcta 1620
gcgcgttctt actatatgcc actgtgtaga ctagtcttct agcggccgaa aatctgctat 1680
caacaat 1687

<210> 14

<211> 288

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 14

Met Ala Gln His Pro Leu Val Gln Arg Leu Leu Asp Val Lys Phe Asp
1 5 10 15

Thr Lys Arg Phe Val Ala Ile Ala Thr His Gly Pro Lys Asn Phe Pro
20 25 30

Asp Ala Glu Gly Arg Lys Phe Phe Ala Asp His Phe Asp Val Thr Ile
35 40 45

Gln Ala Ser Ile Leu Tyr Met Val Val Val Phe Gly Thr Lys Trp Phe
50 55 60

Met Arg Asn Arg Gln Pro Phe Gln Leu Thr Ile Pro Leu Asn Ile Trp
65 70 75 80

Asn Phe Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Ala Gly Ala Val Lys Met Thr
85 90 95

Pro Glu Phe Phe Gly Thr Ile Ala Asn Lys Gly Ile Val Ala Ser Tyr
100 105 110

Cys Lys Val Phe Asp Phe Thr Lys Gly Glu Asn Gly Tyr Trp Val Trp
115 120 125

Leu Phe Met Ala Ser Lys Leu Phe Glu Leu Val Asp Thr Ile Phe Leu
130 135 140

Val Leu Arg Lys Arg Pro Leu Met Phe Leu His Trp Tyr His His Ile
145 150 155 160

5

ES 2 715 640 T3

Leu Thr Met Ile Tyr Ala Trp Tyr Ser His Pro Leu Thr Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Arg Tyr Gly Ile Tyr Leu Asn Phe Val Val His Ala Phe Met Tyr
 180 185 190
 Ser Tyr Tyr Phe Leu Arg Ser Met Lys Ile Arg Val Pro Gly Phe Ile
 195 200 205
 Ala Gln Ala Ile Thr Ser Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Ile Ser Cys
 210 215 220
 Ala Val Leu Ala His Leu Gly Tyr Leu Met His Phe Thr Asn Ala Asn
 225 230 235
 Cys Asp Phe Glu Pro Ser Val Phe Lys Leu Ala Val Phe Met Asp Thr
 245 250 255
 Thr Tyr Leu Ala Leu Phe Val Asn Phe Phe Leu Gln Ser Tyr Val Leu
 260 265 270
 Arg Gly Gly Lys Asp Lys Tyr Lys Ala Val Pro Lys Lys Lys Asn Asn
 275 280 285
 <210> 15
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*
 <400> 15
 Met Gly Gly Gly Gly Gln Gln Thr Asp Arg Ile Thr Asp Thr Asn Gly
 1 5 10 15
 Arg Phe Ser Ser Tyr Thr Trp Glu Glu Val Gln Lys His Thr Lys His
 20 25 30
 Gly Asp Gln Trp Val Val Val Glu Arg Lys Val Tyr Asn Val Ser Gln
 35 40 45
 Trp Val Lys Arg His Pro Gly Gly Leu Arg Ile Leu Gly His Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Glu Asp Ala Thr Glu Ala Phe Thr Ala Phe His Pro Asn Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Lys Tyr Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Glu Leu Glu Ala
 85 90 95
 Ser Glu Pro Ser Gln Asp Arg Gln Lys Asn Ala Ala Leu Val Glu Asp
 100 105 110
 Phe Arg Ala Leu Arg Glu Arg Leu Glu Ala Glu Gly Cys Phe Lys Thr
 115 120 125

5

ES 2 715 640 T3

Gln Pro Leu Phe Phe Ala Leu His Leu Gly His Ile Leu Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ile Ala Phe Met Met Val Trp Tyr Phe Gly Thr Gly Trp Ile Asn
145 150 155 160

Thr Leu Ile Val Ala Val Ile Leu Ala Thr Ala Gln Ser Gln Ala Gly
165 170 175

Trp Leu Gln His Asp Phe Gly His Leu Ser Val Phe Lys Thr Ser Gly
180 185 190

Met Asn His Leu Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala
195 200 205

Ser Ala Gly Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala Lys Pro
210 215 220

Asn Ile Phe Lys Lys Asp Pro Asp Val Asn Met Leu Asn Ala Phe Val
225 230 235 240

Val Gly Asn Val Gln Pro Val Glu Tyr Gly Val Lys Lys Ile Lys His
245 250 255

Leu Pro Tyr Asn His Gln His Lys Tyr Phe Phe Phe Ile Gly Pro Pro
260 265 270

Leu Leu Ile Pro Val Tyr Phe Gln Phe Gln Ile Phe His Asn Met Ile
275 280 285

Ser His Gly Met Trp Val Asp Leu Leu Trp Cys Ile Ser Tyr Tyr Val
290 295 300

Arg Tyr Phe Leu Cys Tyr Thr Gln Phe Tyr Gly Val Phe Trp Ala Ile
305 310 315 320

Ile Leu Phe Asn Phe Val Arg Phe Met Glu Ser His Trp Phe Val Trp
325 330 335

Val Thr Gln Met Ser His Ile Pro Met Asn Ile Asp Tyr Glu Lys Asn
340 345 350

Gln Asp Trp Leu Ser Met Gln Leu Val Ala Thr Cys Asn Ile Glu Gln
355 360 365

Ser Ala Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
370 375 380

His His Leu Phe Pro Thr Val Pro Arg His Asn Tyr Trp Arg Ala Ala
385 390 395 400

ES 2 715 640 T3

Pro Arg Val Arg Ala Leu Cys Glu Lys Tyr Gly Val Lys Tyr Gln Glu
 405 410 415

Lys Thr Leu Tyr Gly Ala Phe Ala Asp Ile Ile Arg Ser Leu Glu Lys
 420 425 430

Ser Gly Glu Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu Asn Lys
 435 440

<210> 16
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

Met Ala Pro Asp Pro Leu Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gln Gly Leu Thr
 1 5 10 15

Pro Arg Tyr Phe Thr Trp Asp Glu Val Ala Gln Arg Ser Gly Cys Glu
 20 25 30

Glu Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val Tyr Asn Ile Ser Glu Phe
 35 40 45

Thr Arg Arg His Pro Gly Gly Ser Arg Val Ile Ser His Tyr Ala Gly
 50 55 60

Gln Asp Ala Thr Asp Pro Phe Val Ala Phe His Ile Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80

Val Lys Lys Tyr Met Asn Ser Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ser Pro Glu
 85 90 95

Gln Pro Ser Phe Glu Pro Thr Lys Asn Lys Glu Leu Thr Asp Glu Phe
 100 105 110

Arg Glu Leu Arg Ala Thr Val Glu Arg Met Gly Leu Met Lys Ala Asn
 115 120 125

His Val Phe Phe Leu Leu Tyr Leu Leu His Ile Leu Leu Leu Asp Gly
 130 135 140

Ala Ala Trp Leu Thr Leu Trp Val Phe Gly Thr Ser Phe Leu Pro Phe
 145 150 155 160

Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu Ser Ala Val Gln Ala Gln Ala Gly Trp
 165 170 175

Leu Gln His Asp Phe Gly His Leu Ser Val Phe Ser Thr Ser Lys Trp
 180 185 190

Asn His Leu Leu His His Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala Pro

ES 2 715 640 T3

	195		200		205														
Ala	Ser	Trp	Trp	Asn	His	Met	His	Phe	Gln	His	His	Ala	Lys	Pro	Asn				
	210					215					220								
Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asp	Ile	Asn	Met	His	Pro	Phe	Phe	Phe	Ala				
	225				230					235					240				
Leu	Gly	Lys	Ile	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Gly	Lys	Gln	Lys	Lys	Asn	Tyr				
				245					250					255					
Met	Pro	Tyr	Asn	His	Gln	His	Lys	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ile	Gly	Pro	Pro				
			260					265					270						
Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Phe	Gln	Trp	Tyr	Ile	Phe	Tyr	Phe	Val	Ile				
		275					280					285							
Gln	Arg	Lys	Lys	Trp	Val	Asp	Leu	Ala	Trp	Met	Ile	Thr	Phe	Tyr	Val				
	290					295					300								
Arg	Phe	Phe	Leu	Thr	Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu				
	305				310					315					320				
Gly	Leu	Phe	Phe	Ile	Val	Arg	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Trp	Phe	Val	Trp				
				325					330					335					
Val	Thr	Gln	Met	Asn	His	Ile	Pro	Met	His	Ile	Asp	His	Asp	Arg	Asn				
			340					345					350						
Met	Asp	Trp	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Gln	Ala	Thr	Cys	Asn	Val	His	Lys				
		355					360					365							
Ser	Ala	Phe	Asn	Asp	Trp	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Asn	Phe	Gln	Ile	Glu				
	370					375					380								
His	His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Arg	His	Asn	Tyr	His	Lys	Val	Ala				
	385				390					395					400				
Pro	Leu	Val	Gln	Ser	Leu	Cys	Ala	Lys	His	Gly	Ile	Glu	Tyr	Gln	Ser				
				405					410					415					
Lys	Pro	Leu	Leu	Ser	Ala	Phe	Ala	Asp	Ile	Ile	His	Ser	Leu	Lys	Glu				
			420					425					430						
Ser	Gly	Gln	Leu	Trp	Leu	Asp	Ala	Tyr	Leu	His	Gln								
		435					440												

<210> 17
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> *Pythium irregulare*
 <400> 17

ES 2 715 640 T3

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Gln Glu Val Ala Lys
1 5 10 15

His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile Ile Arg Gly Glu Val Tyr
20 25 30

Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Lys His Pro Gly Gly Ser Glu Leu Ile
35 40 45

Val Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr Phe Tyr Ser Tyr His
50 55 60

Pro Phe Ser Asn Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Lys Ile Gly
65 70 75 80

Lys Leu Val Gly Gly Tyr Glu Phe Pro Val Phe Lys Pro Asp Ser Gly
85 90 95

Phe Tyr Lys Glu Cys Ser Glu Arg Val Ala Glu Tyr Phe Lys Thr Asn
100 105 110

Asn Leu Asp Pro Lys Ala Ala Phe Ala Gly Leu Trp Arg Met Val Phe
115 120 125

Val Phe Ala Val Ala Ala Leu Ala Tyr Met Gly Met Asn Glu Leu Ile
130 135 140

Pro Gly Asn Val Tyr Ala Gln Tyr Ala Trp Gly Val Val Phe Gly Val
145 150 155 160

Phe Gln Ala Leu Pro Leu Leu His Val Met His Asp Ser Ser His Ala
165 170 175

Ala Cys Ser Ser Ser Pro Ala Met Trp Gln Ile Ile Gly Arg Gly Val
180 185 190

Met Asp Trp Phe Ala Gly Ala Ser Met Val Ser Trp Leu Asn Gln His
195 200 205

Val Val Gly His His Ile Tyr Thr Asn Val Ala Gly Ala Asp Pro Asp
210 215 220

Leu Pro Val Asp Phe Glu Ser Asp Val Arg Arg Ile Val His Arg Gln
225 230 235 240

Val Leu Leu Pro Ile Tyr Lys Phe Gln His Ile Tyr Leu Pro Pro Leu
245 250 255

Tyr Gly Val Leu Gly Leu Lys Phe Arg Ile Gln Asp Val Phe Glu Thr
260 265 270

ES 2 715 640 T3

Phe Val Ser Leu Thr Asn Gly Pro Val Arg Val Asn Pro His Pro Val
 275 280 285

Ser Asp Trp Val Gln Met Ile Phe Ala Lys Ala Phe Trp Thr Phe Tyr
 290 300

Arg Ile Tyr Ile Pro Leu Val Trp Leu Lys Ile Thr Pro Ser Thr Phe
 305 310 315 320

Trp Gly Val Phe Phe Leu Ala Glu Phe Thr Thr Gly Trp Tyr Leu Ala
 325 330 335

Phe Asn Phe Gln Val Ser His Val Ser Thr Glu Cys Glu Tyr Pro Cys
 340 345 350

Gly Asp Ala Pro Ser Ala Glu Val Gly Asp Glu Trp Ala Ile Ser Gln
 355 360 365

Val Lys Ser Ser Val Asp Tyr Ala His Gly Ser Pro Leu Ala Ala Phe
 370 375 380

Leu Cys Gly Ala Leu Asn Tyr Gln Val Thr His His Leu Tyr Pro Gly
 385 390 400

Ile Ser Gln Tyr His Tyr Pro Ala Ile Ala Pro Ile Ile Ile Asp Val
 405 410 415

Cys Lys Lys Tyr Asn Ile Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu
 420 425 430

Ala Leu Leu Ala His Phe Lys His Leu Lys Asn Met Gly Glu Leu Gly
 435 440 445

Lys Pro Val Glu Ile His Met Gly
 450 455

<210> 18
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> *Thraustochytrium* sp.

5

<400> 18
 Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu
 20 25 30

Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe
 35 40 45

Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu
 50 55 60

ES 2 715 640 T3

Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu
 100 105 110
 Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr
 115 120 125
 Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met
 130 135 140
 Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly
 165 170 175
 Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe
 180 185 190
 Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His
 195 200 205
 Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu
 210 215 220
 Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val
 225 230 235 240
 Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu
 245 250 255
 Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr
 260 265 270
 Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val
 275 280 285
 Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu
 290 295 300
 Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly
 305 310 315 320
 Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His
 325 330 335

ES 2 715 640 T3

Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala
 340 345 350

Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp
 355 360 365

Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
 370 375 380

Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
 385 390 400

Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
 405 410 415

Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly
 420 425 430

Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp
 435

<210> 19
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Motiereila alpina*

5

<400> 19
 Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

His Asn Thr Lys Gly Asp Leu Phe Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
 20 25 30

Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu
 35 40 45

Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 50 55 60

Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Val Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 85 90 95

Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asp Ile
 100 105 110

Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe
 115 120 125

Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val

ES 2 715 640 T3

130 135 140

Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe
145 150 155 160

Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe
165 170 175

Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His
180 185 190

Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met
195 200 205

Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val
210 215 220

Ser Thr Phe Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp
225 230 235 240

Phe Val Asn His Ile Asn Gln Asp Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly
245 250 255

Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe
260 265 270

Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His
275 280 285

Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu
290 295 300

Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe
305 310 315 320

Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln
325 330 335

Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn
340 345 350

Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln
355 360 365

Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu
370 375 380

Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His
385 390 395 400

Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys
405 410 415

ES 2 715 640 T3

Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His
 420 425 430

Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu
 435 440 445

<210> 20

<211> 447

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 20

Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp
 1 5 10 15

Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly
 20 25 30

Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe
 35 40 45

His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu
 50 55 60

Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys
 65 70 75 80

Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn
 85 90 95

Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu
 100 105 110

Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe
 115 120 125

Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe
 130 135 140

Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly
 145 150 155 160

Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His
 165 170 175

Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val
 180 185 190

Gly Asn Phe Leu Gln Gly Phe Ser Ser Gly Gly Trp Lys Glu Gln His
 195 200 205

5

ES 2 715 640 T3

Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu
210 215 220

Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr
225 230 235 240

Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu Phe Arg Trp Gln His Val His
245 250 255

Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser
260 265 270

Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg
275 280 285

Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp
290 295 300

Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met
305 310 315 320

Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly Phe Leu Leu Ser His Val
325 330 335

Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn
340 345 350

Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met
355 360 365

Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln
370 375 380

Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr
385 390 395 400

Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr
405 410 415

Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe
420 425 430

Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala
435 440 445

<210> 21

<211> 444

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Met Gly Lys Gly Gly Asn Gln Gly Glu Gly Ala Ala Glu Arg Glu Val
1 5 10 15

5

ES 2 715 640 T3

Ser Val Pro Thr Phe Ser Trp Glu Glu Ile Gln Lys His Asn Leu Arg
 20 25 30

Thr Asp Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val Tyr Asn Ile Thr Lys
 35 40 45

Trp Ser Ile Gln His Pro Gly Gly Gln Arg Val Ile Gly His Tyr Ala
 50 55 60

Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Arg Ala Phe His Pro Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Phe Val Gly Lys Phe Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ala Pro
 85 90 95

Glu Glu Pro Ser Gln Asp His Gly Lys Asn Ser Lys Ile Thr Glu Asp
 100 105 110

Phe Arg Ala Leu Arg Lys Thr Ala Glu Asp Met Asn Leu Phe Lys Thr
 115 120 125

Asn His Val Phe Phe Leu Leu Leu Leu Ala His Ile Ile Ala Leu Glu
 130 135 140

Ser Ile Ala Trp Phe Thr Val Phe Tyr Phe Gly Asn Gly Trp Ile Pro
 145 150 155 160

Thr Leu Ile Thr Ala Phe Val Leu Ala Thr Ser Gln Ala Gln Ala Gly
 165 170 175

Trp Leu Gln His Asp Tyr Gly His Leu Ser Val Tyr Arg Lys Pro Lys
 180 185 190

Trp Asn His Leu Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala
 195 200 205

Ser Ala Asn Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala Lys Pro
 210 215 220

Asn Ile Phe His Lys Asp Pro Asp Val Asn Met Leu His Val Phe Val
 225 230 235 240

Leu Gly Glu Trp Gln Pro Ile Glu Tyr Gly Lys Lys Lys Leu Lys Tyr
 245 250 255

Leu Pro Tyr Asn His Gln His Glu Tyr Phe Phe Leu Ile Gly Pro Pro
 260 265 270

Leu Leu Ile Pro Met Tyr Phe Gln Tyr Gln Ile Ile Met Thr Met Ile
 275 280 285

ES 2 715 640 T3

Val His Lys Asn Trp Val Asp Leu Ala Trp Ala Val Ser Tyr Tyr Ile
290 295 300

Arg Phe Phe Ile Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Gly Ile Leu Gly Ala Leu
305 310 315 320

Leu Phe Leu Asn Phe Ile Arg Phe Leu Glu Ser His Trp Phe Val Trp
325 330 335

Val Thr Gln Met Asn His Ile Val Met Glu Ile Asp Gln Glu Ala Tyr
340 345 350

Arg Asp Trp Phe Ser Ser Gln Leu Thr Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln
355 360 365

Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
370 375 380

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala
385 390 395 400

Pro Leu Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu
405 410 415

Lys Pro Leu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Ile Ile Arg Ser Leu Lys Lys
420 425 430

Ser Gly Lys Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys
435 440

<210> 22

<211> 444

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 22

Met Gly Lys Gly Gly Asn Gln Gly Glu Gly Ser Thr Glu Arg Gln Ala
1 5 10 15

Pro Met Pro Thr Phe Arg Trp Glu Glu Ile Gln Lys His Asn Leu Arg
20 25 30

Thr Asp Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val Tyr Asn Val Thr Lys
35 40 45

Trp Ser Gln Arg His Pro Gly Gly His Arg Val Ile Gly His Tyr Ser
50 55 60

Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Arg Ala Phe His Leu Asp Leu Asp
65 70 75 80

Phe Val Gly Lys Phe Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ala Pro

5

ES 2 715 640 T3

				85					90					95		
Glu	Glu	Pro	Ser 100	Leu	Asp	Arg	Gly	Lys 105	Ser	Ser	Gln	Ile	Thr 110	Glu	Asp	
Phe	Arg	Ala 115	Leu	Lys	Lys	Thr	Ala 120	Glu	Asp	Met	Asn	Leu 125	Phe	Lys	Thr	
Asn	His 130	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu 135	Leu	Leu	Ser	His	Ile 140	Ile	Val	Met	Glu	
Ser 145	Leu	Ala	Trp	Phe	Ile 150	Leu	Ser	Tyr	Phe	Gly 155	Thr	Gly	Trp	Ile	Pro 160	
Thr	Leu	Val	Thr	Ala 165	Phe	Val	Leu	Ala	Thr 170	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala 175	Gly	
Trp	Leu	Gln	His 180	Asp	Tyr	Gly	His	Leu 185	Ser	Val	Tyr	Lys	Lys 190	Ser	Ile	
Trp	Asn	His 195	Val	Val	His	Lys	Phe 200	Val	Ile	Gly	His	Leu 205	Lys	Gly	Ala	
Ser	Ala 210	Asn	Trp	Trp	Asn	His 215	Arg	His	Phe	Gln	His 220	His	Ala	Lys	Pro	
Asn 225	Ile	Phe	His	Lys	Asp 230	Pro	Asp	Ile	Lys	Ser 235	Leu	His	Val	Phe	Val 240	
Leu	Gly	Glu	Trp	Gln 245	Pro	Leu	Glu	Tyr	Gly 250	Lys	Lys	Lys	Leu	Lys 255	Tyr	
Leu	Pro	Tyr	Asn 260	His	Gln	His	Glu	Tyr 265	Phe	Phe	Leu	Ile	Gly 270	Pro	Pro	
Leu	Leu	Ile 275	Pro	Met	Tyr	Phe	Gln 280	Tyr	Gln	Ile	Ile	Met 285	Thr	Met	Ile	
Ser	Arg 290	Arg	Asp	Trp	Val	Asp 295	Leu	Ala	Trp	Ala	Ile 300	Ser	Tyr	Tyr	Met	
Arg 305	Phe	Phe	Tyr	Thr	Tyr 310	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly 315	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu 320	
Val	Phe	Leu	Asn	Phe 325	Ile	Arg	Phe	Leu	Glu 330	Ser	His	Trp	Phe	Val 335	Trp	
Val	Thr	Gln	Met 340	Asn	His	Leu	Val	Met 345	Glu	Ile	Asp	Leu	Asp 350	His	Tyr	
Arg	Asp	Trp 355	Phe	Ser	Ser	Gln	Leu 360	Ala	Ala	Thr	Cys	Asn 365	Val	Glu	Gln	

ES 2 715 640 T3

Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
370 375 380

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala
385 390 395 400

Pro Leu Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu
405 410 415

Lys Pro Leu Leu Arg Ala Leu Ile Asp Ile Val Ser Ser Leu Lys Lys
420 425 430

Ser Gly Glu Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys
435 440

<210> 23

<211> 459

<212> PRT

<213> *Pythium irregulare*

5

<400> 23

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu
1 5 10 15

Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His
20 25 30

Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val
35 40 45

Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe
50 55 60

His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp
65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp
85 90 95

Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr
100 105 110

Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser
115 120 125

Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val
130 135 140

Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met
145 150 155 160

ES 2 715 640 T3

Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu
165 170 175

Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly
180 185 190

Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Val
195 200 205

Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu
210 215 220

His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr
225 230 235 240

Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu
245 250 255

Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe
260 265 270

Pro Leu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe
275 280 285

Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe
290 295 300

Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu
305 310 315 320

Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr
325 330 335

Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe
340 345 350

Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro
355 360 365

Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser
370 375 380

Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His
385 390 395 400

His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val
405 410 415

Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr
420 425 430

Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile

ES 2 715 640 T3

435 440 445
 Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met
 450 455
 <210> 24
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> *Boago officinalis*
 <400> 24
 Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu
 35 40 45
 Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55
 Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110
 Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly
 130 135 140
 Cys Leu Met Gly Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met
 165 170
 Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr
 195 200 205
 Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Phe
 210 215 220

ES 2 715 640 T3

Phe Gly Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp
225 230 235 240

Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro
245 250 255

Ile Met Cys Ala Ala Arg Leu Asn Met Tyr Val Gln Ser Leu Ile Met
260 265 270

Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Cys Leu Val Phe Ser Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
290 295 300

Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Ile Ala Ser Leu Ser Val Thr
305 310 315 320

Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val
325 330 335

Tyr Val Gly Lys Pro Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Asp
340 345 350

Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp Phe His Gly
355 360 365

Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Lys Met Pro Arg
370 375 380

Cys Asn Leu Arg Lys Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys
385 390 400

His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met
405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr
420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly
435 440 445

<210> 25

<211> 446

<212> PRT

<213> *Anemone leveillei*

<400> 25

Met Ala Glu Lys Arg Arg Ser Ile Ser Ser Asp Asp Leu Arg Ser His
1 5 10 15

Asn Lys Pro Gly Asp Val Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ile Tyr Asp

ES 2 715 640 T3

20 25 30
 Val Thr Glu Trp Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Glu Gly Pro Leu Leu
 35 40 45
 Asn Leu Ala Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His Pro
 50 55 60
 Gly Ser Ala Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe His Ile Gly Tyr Leu Gln
 65 70 75 80
 Asp Tyr Val Val Ser Asp Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu Val Ser
 85 90 95
 Glu Phe Ser Lys Ala Gly Leu Tyr Glu Lys Lys Gly His Gly His Leu
 100 105 110
 Ile Arg Leu Leu Val Met Ser Leu Val Phe Ile Ala Ser Val Ser Gly
 115 120 125
 Val Val Leu Ser Asp Lys Thr Ser Val His Val Gly Ser Ala Val Leu
 130 135 140
 Leu Ala Val Ile Trp Met Gln Phe Gly Phe Ile Gly His Asp Ser Gly
 145 150 155 160
 His Tyr Asn Ile Met Thr Ser Pro Glu Leu Asn Arg Tyr Met Gln Ile
 165 170 175
 Phe Ser Val Asn Val Val Ser Gly Val Ser Val Gly Trp Trp Lys Arg
 180 185 190
 Tyr His Asn Ala His His Ile Ala Val Asn Ser Leu Glu Tyr Asp Pro
 195 200 205
 Asp Leu Gln Tyr Val Pro Phe Leu Val Val Ser Thr Ala Ile Phe Asp
 210 215 220
 Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Arg Lys Lys Met Thr Phe Asp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Phe Leu Val Ser Phe Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Leu Met
 245 250 255
 Ala Ile Gly Arg Val Ser Phe Leu Ala Gln Ser Ile Gly Val Leu Leu
 260 265 270
 Ser Lys Lys Pro Leu Pro Asp Arg His Leu Glu Trp Phe Gly Leu Val
 275 280 285
 Val Phe Trp Ala Trp Tyr Ser Leu Leu Ile Ser Cys Leu Pro Asn Trp
 290 295 300

ES 2 715 640 T3

Trp Glu Arg Val Ile Phe Ile Ala Val Asn Phe Ala Val Thr Gly Ile
305 310 315 320

Gln His Val Gln Phe Cys Leu Asn His Tyr Ser Ala Gln Thr Tyr Ile
325 330 335

Gly Ala Pro Cys Ala Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Lys Gly Ser
340 345 350

Ile Asp Ile Ser Cys Ser Pro Trp Thr Asp Trp Phe His Gly Gly Leu
355 360 365

Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro Arg Cys Asn
370 375 380

Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Lys Glu Leu Cys Arg Lys His Asn
385 390 395 400

Leu Val Tyr Thr Ser Val Ser Phe Phe Glu Gly Asn Arg Arg Thr Leu
405 410 415

Ala Thr Leu Lys Asn Ala Ala Leu Lys Ala Arg Asp Leu Thr Ser Pro
420 425 430

Ile Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Val His Thr His Gly
435 440 445

<210> 26

<211> 520

<212> PRT

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 26

Met Val Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu
20 25 30

Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe
35 40 45

Ala Phe Lys Arg Leu Thr Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val
50 55 60

Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys
85 90 95

5

ES 2 715 640 T3

Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln
 100 105 110
 Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe
 115 120 125
 Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg
 130 135 140
 Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys
 145 150 155 160
 Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr
 165 170 175
 Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg
 180 185 190
 Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu
 195 200 205
 Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr
 210 215 220
 Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe
 225 230 235 240
 Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val
 245 250 255
 Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn
 260 265 270
 Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu
 275 280 285
 His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp
 290 295 300
 Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His
 325 330 335
 Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe
 340 345 350
 Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys
 355 360 365
 Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser

ES 2 715 640 T3

370 375 380

Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val
 385 390 395 400

Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu
 405 410 415

Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn
 420 425 430

Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp
 435 440 445

Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
 450 455 460

Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr
 465 470 475 480

Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser
 485 490 495

Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala
 500 505 510

Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser
 515 520

<210> 27
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 27
 Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95

5

ES 2 715 640 T3

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
340 345 350

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
355 360 365

ES 2 715 640 T3

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
 370 375 380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
 385 390 395 400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
 405 410 415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
 420 425 430 435

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
 435 440 445

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 450 455 460

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
 465 470 475 480

Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
 485 490 495

Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
 500 505 510 515

Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 515 520 525

<210> 28
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> *Motiereila alpina*

<400> 28
 Met Ala Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu Ile Leu
 1 5 10 15

Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala Pro Phe
 20 25 30

Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe Val Pro
 35 40 45

Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys Asp Gly
 50 55 60

Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Ala Ile Lys
 85 90 95

5

ES 2 715 640 T3

Asn Asp Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln
 100 105 110
 Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val
 115 120 125
 Ser Phe Asn Leu Cys Ile Trp Gly Leu Ser Thr Phe Ile Val Ala Lys
 130 135 140
 Trp Gly Gln Thr Ser Thr Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
 165 170 175
 His Gln Val Phe Gln Asp Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe
 180 185 190
 Leu Gly Gly Val Cys Gln Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys
 195 200 205
 His Asn Thr His His Ala Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp
 210 215 220
 Ile Asp Thr His Pro Leu Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met
 225 230 235 240
 Phe Ser Asp Val Pro Asp Glu Glu Leu Thr Arg Met Trp Ser Arg Phe
 245 250 255
 Met Val Leu Asn Gln Thr Trp Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Ser Phe Ala
 260 265 270
 Arg Leu Ser Trp Cys Leu Gln Ser Ile Met Phe Val Leu Pro Asn Gly
 275 280 285
 Gln Ala His Lys Pro Ser Gly Ala Arg Val Pro Ile Ser Leu Val Glu
 290 295 300
 Gln Leu Ser Leu Ala Met His Trp Thr Trp Tyr Leu Ala Thr Met Phe
 305 310 315 320
 Leu Phe Ile Lys Asp Pro Val Asn Met Ile Val Tyr Phe Leu Val Ser
 325 330 335
 Gln Ala Val Cys Gly Asn Leu Leu Ala Ile Val Phe Ser Leu Asn His
 340 345 350
 Asn Gly Met Pro Val Ile Ser Lys Glu Glu Ala Val Asp Met Asp Phe
 355 360 365

ES 2 715 640 T3

Phe Thr Lys Gln Ile Ile Thr Gly Arg Asp Val His Pro Gly Leu Phe
370 375 380

Ala Asn Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu
385 390 395 400

Phe Pro Ser Met Pro Arg His Asn Phe Ser Lys Ile Gln Pro Ala Val
405 410 415

Glu Thr Leu Cys Lys Lys Tyr Gly Val Arg Tyr His Thr Thr Gly Met
420 425 430

Ile Glu Gly Thr Ala Glu Val Phe Ser Arg Leu Asn Glu Val Ser Lys
435 440 445

Ala Ala Ser Lys Met Gly Lys Ala Gln
450 455

<210> 29

<211> 443

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 29

Met Val Val Asp Lys Asn Ala Ser Gly Leu Arg Met Lys Val Asp Gly
1 5 10 15

Lys Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Leu Val Lys Lys His Pro Gly Gly
20 25 30

Ala Val Ile Glu Gln Tyr Arg Asn Ser Asp Ala Thr His Ile Phe His
35 40 45

Ala Phe His Glu Gly Ser Ser Gln Ala Tyr Lys Gln Leu Asp Leu Leu
50 55 60

Lys Lys His Gly Glu His Asp Glu Phe Leu Glu Lys Gln Leu Glu Lys
65 70 75 80

Arg Leu Asp Lys Val Asp Ile Asn Val Ser Ala Tyr Asp Val Ser Val
85 90 95

Ala Gln Glu Lys Lys Met Val Glu Ser Phe Glu Lys Leu Arg Gln Lys
100 105 110

Leu His Asp Asp Gly Leu Met Lys Ala Asn Glu Thr Tyr Phe Leu Phe
115 120 125

Lys Ala Ile Ser Thr Leu Ser Ile Met Ala Phe Ala Phe Tyr Leu Gln
130 135 140

Tyr Leu Gly Trp Tyr Ile Thr Ser Ala Cys Leu Leu Ala Leu Ala Trp

5

ES 2 715 640 T3

Asn Met Ala Glu His Ile Gln Ala Lys Ala Ala
 435 440

<210> 30
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

Met Glu His Phe Asp Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Phe Lys Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Arg Asp Thr Arg Val Lys Gly Trp Phe Leu Leu Asp Asn Tyr
 20 25 30

Ile Pro Thr Phe Ile Cys Ser Val Ile Tyr Leu Leu Ile Val Trp Leu
 35 40 45

Gly Pro Lys Tyr Met Arg Asn Lys Gln Pro Phe Ser Cys Arg Gly Ile
 50 55 60

Leu Val Val Tyr Asn Leu Gly Leu Thr Leu Leu Ser Leu Tyr Met Phe
 65 70 75 80

Cys Glu Leu Val Thr Gly Val Trp Glu Gly Lys Tyr Asn Phe Phe Cys
 85 90 95

Gln Gly Thr Arg Thr Ala Gly Glu Ser Asp Met Lys Ile Ile Arg Val
 100 105 110

Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Ile Glu Phe Met Asp Thr Phe
 115 120 125

Phe Phe Ile Leu Arg Lys Asn Asn His Gln Ile Thr Val Leu His Val
 130 135 140

Tyr His His Ala Ser Met Leu Asn Ile Trp Trp Phe Val Met Asn Trp
 145 150 155 160

Val Pro Cys Gly His Ser Tyr Phe Gly Ala Thr Leu Asn Ser Phe Ile
 165 170 175

His Val Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ser Val Pro Ser Met
 180 185 190

Arg Pro Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Gln Gly Gln Leu Leu
 195 200 205

Gln Phe Val Leu Thr Ile Ile Gln Thr Ser Cys Gly Val Ile Trp Pro
 210 215 220

ES 2 715 640 T3

Cys Thr Phe Pro Leu Gly Trp Leu Tyr Phe Gln Ile Gly Tyr Met Ile
225 230 235 240

Ser Leu Ile Ala Leu Phe Thr Asn Phe Tyr Ile Gln Thr Tyr Asn Lys
245 250 255

Lys Gly Ala Ser Arg Arg Lys Asp His Leu Lys Asp His Gln Asn Gly
260 265 270

Ser Met Ala Ala Val Asn Gly His Thr Asn Ser Phe Ser Pro Leu Glu
275 280 285

Asn Asn Val Lys Pro Arg Lys Leu Arg Lys Asp
290 295

<210> 31

<211> 290

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 31

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
165 170 175

5

ES 2 715 640 T3

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

Thr Glu
 290

- <210> 32
- <211> 318
- <212> PRT
- <213> *Motiereila alpina*

5

<400> 32
 Met Glu Ser Ile Ala Pro Phe Leu Pro Ser Lys Met Pro Gln Asp Leu
 1 5 10 15

Phe Met Asp Leu Ala Thr Ala Ile Gly Val Arg Ala Ala Pro Tyr Val
 20 25 30

Asp Pro Leu Glu Ala Ala Leu Val Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Ile Pro
 35 40 45

Thr Ile Val His His Thr Arg Gly Phe Leu Val Ala Val Glu Ser Pro
 50 55 60

Leu Ala Arg Glu Leu Pro Leu Met Asn Pro Phe His Val Leu Leu Ile
 65 70 75 80

Val Leu Ala Tyr Leu Val Thr Val Phe Val Gly Met Gln Ile Met Lys
 85 90 95

Asn Phe Glu Arg Phe Glu Val Lys Thr Phe Ser Leu Leu His Asn Phe
 100 105 110

ES 2 715 640 T3

Cys Leu Val Ser Ile Ser Ala Tyr Met Cys Gly Gly Ile Leu Tyr Glu
115 120 125

Ala Tyr Gln Ala Asn Tyr Gly Leu Phe Glu Asn Ala Ala Asp His Thr
130 135 140

Phe Lys Gly Leu Pro Met Ala Lys Met Ile Trp Leu Phe Tyr Phe Ser
145 150 155 160

Lys Ile Met Glu Phe Val Asp Thr Met Ile Met Val Leu Lys Lys Asn
165 170 175

Asn Arg Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Phe
180 185 190

Thr Ile Trp Trp Leu Val Thr Phe Val Ala Pro Asn Gly Glu Ala Tyr
195 200 205

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Phe Ile His Val Ile Met Tyr Gly Tyr
210 215 220

Tyr Phe Leu Ser Ala Leu Gly Phe Lys Gln Val Ser Phe Ile Lys Phe
225 230 235 240

Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met Ser Val Gln
245 250 255

Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Tyr
260 265 270

Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu Leu Trp Phe Tyr Met Trp Thr Met Leu
275 280 285

Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Leu Ala Lys Gln
290 295 300

Ala Lys Ala Asp Ala Ala Lys Glu Lys Ala Arg Lys Leu Gln
305 310 315

<210> 33

<211> 519

<212> PRT

<213> *Thraustochytrium sp.*

5

<400> 33

Met Thr Val Gly Tyr Asp Glu Glu Ile Pro Phe Glu Gln Val Arg Ala
1 5 10 15

His Asn Lys Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly His Val Tyr
20 25 30

Asp Val Thr Lys Phe Ala Ser Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Leu
35 40 45

ES 2 715 640 T3

Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Val Leu Tyr Glu Thr Tyr His Val
 50 55 60
 Arg Gly Val Ser Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Arg Ile Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Pro Asp Gly Gln Gly Gly Ala Asn Glu Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ser
 85 90 95
 Gly Leu Ser Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Trp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg
 100 105
 Val Met Arg Glu Arg Val Val Ala Arg Leu Lys Glu Arg Gly Lys Ala
 115 120 125
 Arg Arg Gly Gly Tyr Glu Leu Trp Ile Lys Ala Phe Leu Leu Leu Val
 130 135 140
 Gly Phe Trp Ser Ser Leu Tyr Trp Met Cys Thr Leu Asp Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Ala Ile Leu Ala Ala Met Ser Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val
 165 170 175
 Gly Thr Cys Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Ser
 180 185 190
 Arg Trp Val Asn Lys Val Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala
 195 200 205
 Ser Gly Met Thr Trp Glu Phe Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Leu Ile Glu Glu Glu Asn Gly Leu Gln Lys Val Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Lys Met Asp Thr Lys Leu Ala Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Pro Met Met Arg Leu His Pro Trp His Gln Lys Arg Trp
 260 265 270
 Tyr His Arg Phe Gln His Ile Tyr Gly Pro Phe Ile Phe Gly Phe Met
 275 280 285
 Thr Ile Asn Lys Val Val Thr Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu Phe Gln Ile Asp Ala Glu Cys Arg Tyr Ala Ser Pro Met Tyr
 305 310 315 320

ES 2 715 640 T3

Val Ala Arg Phe Trp Ile Met Lys Ala Leu Thr Val Leu Tyr Met Val
 325 330 335

Ala Leu Pro Cys Tyr Met Gln Gly Pro Trp His Gly Leu Lys Leu Phe
 340 345 350

Ala Ile Ala His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile
 355 360 365

Val Asn His Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val
 370 375 380

Lys Gly Thr Met Ala Pro Pro Lys Thr Met His Gly Val Thr Pro Met
 385 390 400

Asn Asn Thr Arg Lys Glu Val Glu Ala Glu Ala Ser Lys Ser Gly Ala
 405 410 415

Val Val Lys Ser Val Pro Leu Asp Asp Trp Ala Val Val Gln Cys Gln
 420 425 430

Thr Ser Val Asn Trp Ser Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser
 435 440 445

Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Gly Leu Ser
 450 455 460

His Glu Thr Tyr Tyr His Ile Gln Asp Val Phe Gln Ser Thr Cys Ala
 465 470 475 480

Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln His Glu Pro Ser Leu Trp Thr Ala Tyr
 485 490 495

Trp Lys Met Leu Glu His Leu Arg Gln Leu Gly Asn Glu Glu Thr His
 500 505 510

Glu Ser Trp Gln Arg Ala Ala
 515

<210> 34
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> *Euglena gracilis*

5

<400> 34
 Met Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Lys Gln Tyr Ser Gln Lys
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Pro Glu Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Gly Ala Lys Pro
 20 25 30

Gln Pro Cys Glu Asn Gly Thr Val Glu Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala

ES 2 715 640 T3

	35					40						45			
Asn	Val 50	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro 55	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro 60	Ala	Thr	Tyr	Tyr
Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser 70	Gly	Gln	Gly	Lys	Glu 75	Arg	Leu	Phe	Thr	Thr 80
Asp	Glu	Val	Arg	Arg 85	His	Ile	Leu	Pro	Thr 90	Asp	Gly	Trp	Leu	Thr 95	Cys
His	Glu	Gly	Val 100	Tyr	Asp	Val	Thr	Asp 105	Phe	Leu	Ala	Lys	His 110	Pro	Gly
Gly	Gly	Val 115	Ile	Thr	Leu	Gly	Leu 120	Gly	Arg	Asp	Cys	Thr 125	Ile	Leu	Ile
Glu	Ser	Tyr	His	Pro	Ala	Gly 135	Arg	Pro	Asp	Lys	Val 140	Met	Glu	Lys	Tyr
Arg	Ile	Gly	Thr	Leu	Gln 150	Asp	Pro	Lys	Thr	Phe 155	Tyr	Ala	Trp	Gly	Glu 160
Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro 165	Glu	Leu	Lys	Arg	Arg 170	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu 175	Lys
Glu	Ala	Gly	Gln 180	Ala	Arg	Arg	Gly	Gly 185	Leu	Gly	Val	Lys	Ala 190	Leu	Leu
Val	Leu	Thr 195	Leu	Phe	Phe	Val	Ser 200	Trp	Tyr	Met	Trp	Val 205	Ala	His	Lys
Ser	Phe 210	Leu	Trp	Ala	Ala	Val 215	Trp	Gly	Phe	Ala	Gly 220	Ser	His	Val	Gly
Leu	Ser	Ile	Gln	His	Asp 230	Gly	Asn	His	Gly	Ala 235	Phe	Ser	Arg	Asn	Thr 240
Leu	Val	Asn	Arg	Leu 245	Ala	Gly	Trp	Gly	Met 250	Asp	Leu	Ile	Gly	Ala 255	Ser
Ser	Thr	Val 260	Trp	Glu	Tyr	Gln	His	Val 265	Ile	Gly	His	His	Gln 270	Tyr	Thr
Asn	Leu	Val 275	Ser	Asp	Thr	Leu	Phe 280	Ser	Leu	Pro	Glu	Asn 285	Asp	Pro	Asp
Val	Phe 290	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu 295	Met	Arg	Met	His	Pro 300	Asp	Thr	Ala	Trp
Gln	Pro	His	His	Arg	Phe 310	Gln	His	Leu	Phe	Ala 315	Phe	Pro	Leu	Phe	Ala 320

ES 2 715 640 T3

Leu Met Thr Ile Ser Lys Val Leu Thr Ser Asp Phe Ala Val Cys Leu
 325 330 335

Ser Met Lys Lys Gly Ser Ile Asp Cys Ser Ser Arg Leu Val Pro Leu
 340 345 350

Glu Gly Gln Leu Leu Phe Trp Gly Ala Lys Leu Ala Asn Phe Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Val Leu Pro Cys Tyr Leu His Gly Thr Ala Met Gly Leu Ala
 370 375 380

Leu Phe Ser Val Ala His Leu Val Ser Gly Glu Tyr Leu Ala Ile Cys
 385 390 400

Phe Ile Ile Asn His Ile Ser Glu Ser Cys Glu Phe Met Asn Thr Ser
 405 410 415

Phe Gln Thr Ala Ala Arg Arg Thr Glu Met Leu Gln Ala Ala His Gln
 420 425 430

Ala Ala Glu Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Pro Pro Pro Asn Asp Trp
 435 440 445

Ala Val Thr Gln Val Gln Cys Cys Val Asn Trp Arg Ser Gly Gly Val
 450 455 460

Leu Ala Asn His Leu Ser Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His
 465 470 475 480

Leu Phe Pro Ser Ile Ser His Ala Asn Tyr Pro Thr Ile Ala Pro Val
 485 490 495

Val Lys Glu Val Cys Glu Glu Tyr Gly Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Val
 500 505 510

Thr Phe Trp Asp Ala Val Cys Gly Met Val Gln His Leu Arg Leu Met
 515 520 525

Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Asn Gly Asp Lys Lys Ser
 530 535 540

<210> 35
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> *Isochrysis galbana*

<400> 35
 Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
 1 5 10 15

5

ES 2 715 640 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 Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
 260

<210> 36
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Euglena gracilis*
 <400> 36

ES 2 715 640 T3

Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Ser Pro Leu Gln Leu Met Glu Gln
1 5 10 15

Thr Tyr Asp Val Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile Ile Glu
20 25 30

Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met His Phe
35 40 45

Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn Pro Ser
50 55 60

Phe Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln Glu Asp Phe
65 70 75 80

Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Asp Ala Ser
85 90 95

Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly Leu Gly Val
100 105 110

Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe Ile Gly Ala
115 120 125

Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu Ser His Asp
130 135 140

Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn Asn Leu Val
145 150 155 160

Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val Thr Cys Trp
165 170 175

Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val Gln Gly His
180 185 190

Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Pro Leu Ala Trp Ser Glu Asp Asp
195 200 205

Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln Phe Gln Gln
210 215 220

Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile Trp Cys Phe
225 230 235 240

Gln Cys Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn Gln Phe
245 250 255

Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu His Trp
260 265 270

ES 2 715 640 T3

Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile Leu Thr
 275 280 285

Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe Gly Ile
 290 295 300

Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile Gly Asp
 305 310 315 320

Pro Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His Glu Thr
 325 330 335

Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly Gly Leu
 340 345 350

Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg His Asn
 355 360 365

Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys His Asn
 370 375 380

Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile Leu Leu
 385 390 395 400

Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro Ala Gly
 405 410 415

Lys Ala Leu

<210> 37
 <211> 867
 <212> ADN
 <213> *Caenorhabditis elegans*

5

<400> 37
 atggctcagc atccgctcgt tcaacggctt ctcgatgtca aattcgacac gaaacgattt 60
 gtggctattg ctactcatgg gccaaagaat ttccctgacg cagaaggtcg caagttcttt 120
 gctgatcact ttgatgttac tattcaggct tcaatcctgt acatggtcgt tgtgttcgga 180
 acaaaatggt tcatgcgtaa tcgtcaacca ttccaattga ctattccact caacatctgg 240
 aatttcatcc tcgccgcatt ttccatcgca ggagctgtca aaatgacccc agagttcttt 300
 ggaaccattg ccaacaaagg aattgtcgca tcctactgca aagtgtttga tttcacgaaa 360
 ggagagaatg gatactgggt gtggctcttc atggcttcca aacttttcga acttgttgac 420
 accatcttct tggttctccg taaacgtcca ctcatgttcc ttactggta tcaccatatt 480
 ctcaccatga tctacgcctg gtactctcat ccattgaccc caggattcaa cagatacggg 540
 atttatctta actttgtcgt ccacgccttc atgtactctt actacttctt tcgctcgatg 600
 aagattcgcg tgccaggatt catcgcccaa gctatcacat ctcttcaaat cgttcaattc 660

ES 2 715 640 T3

atcatctctt gcgccgttct tgctcatctt ggttatctca tgcacttcac caatgccaac 720
 tgtgatttcg agccatcagt attcaagctc gcagttttca tggacacaac atacttggct 780
 cttttcgtca actttcttct ccaatcatat gttctccgcg gaggaaaaga caagtacaag 840
 gcagtgccaa agaagaagaa caactaa 867

5 <210> 38
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> *Danio rerio*

<400> 38
 atgggtggcg gaggacagca gacagaccga atcaccgaca ccaacggcag attcagcagc 60
 tacacctggg aggaggtgca gaaacacacc aaacatggag atcagtgggt ggtggtggag 120
 aggaaggttt ataacgtcag ccagtgggtg aagagacacc ccggaggact gaggatcctc 180
 ggacactatg ctggagaaga cgccacggag gcgttactg cgtttcatcc aaaccttcag 240
 ctggtgagga aatacctgaa gccgctgcta atcggagagc tggaggcgtc tgaacctcag 300
 caggaccggc agaaaaacgc tgctctcgtg gaggatttcc gagccctgcg tgagcgtctg 360
 gaggctgaag gctgttttaa aacgcagccg ctgtttttcg ctctgcattt gggccacatt 420
 ctgctcctgg aggccatcgc tttcatgatg gtgtggtatt tcggcaccgg ttggatcaac 480
 acgctcatcg tcgctgttat tctggctact gcacagtcac aagctggatg gttgcagcat 540
 gacttcggtc atctgtccgt gtttaaaacc tctggaatga atcatttggg gcacaaattt 600
 gtcatcggac acctgaaggg agcgtctgcg ggctggtgga accatcggca cttccagcat 660
 cacgctaaac ccaacatctt caagaaggac ccggacgtca acatgctgaa cgcctttgtg 720
 gtgggaaacg tgcagcccgt ggagtatggc gttagaaga tcaagcatct gccctacaac 780
 catcagcaca agtacttctt cttcattggt cctcccctgc tcatcccagt gtatttccag 840
 ttccaaatct ttcacaatat gatcagtcac ggcattgtggg tggacctgct gtggtgtatc 900
 agctactacg tccgatactt cctttgttac acgcagttct acggcgtctt ttgggctatt 960
 atcctcttta atttcgtcag gtttatggag agccactggg ttgtttgggt cacacagatg 1020
 agccacatcc ccatgaacat tgactatgag aaaaatcagg actggctcag catgcagctg 1080
 gtcgcgacct gtaacatcga gcagtctgcc ttcaacgact ggttcagcgg acacctcaac 1140
 ttccagatcg agcatcatct ctttcccaca gtgcctcggc acaactactg gcgcgccgct 1200
 ccacgggtgc gagcgttggt tgagaaatac ggagtcaaat accaagagaa gacctgttac 1260
 ggagcatttg cggatatcat taggtctttg gagaaatctg gcgagctctg gctggatgcg 1320
 tatctcaaca aataa 1335

10 <210> 39
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

	<400> 39 cccaagctta ctatgggtgg cggaggacag c	31
5	<210> 40 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de oligonucleótido	
	<400> 40 ccgctggagt tatttggtga gatacgc	27
15	<210> 41 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de oligonucleótido	
25	<400> 41 gcgggtacca tggctcagca tccgctc	27
30	<210> 42 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de oligonucleótido	
35	<400> 42 gcgggatcct tagttgttct tcttctt	27
40	<210> 43 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Región conservada	
45	<400> 43 Asp His Pro Gly Gly Ser 1 5	
50	<210> 44 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Región conservada	
55	<400> 44 Trp Trp Lys Asp Lys His Asn 1 5	
60	<210> 45 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Región conservada

<400> 45
 Gln Ile Glu His His Leu Phe
 1 5

<210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<400> 46
 tggtggaarc ayaarcayaa y 21

<210> 47
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n = cualquier nucleótido

<400> 47
 gcgagggatc caaggraana rrtgrtgytc 30

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región conservada

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = cualquier aminoácido

<400> 48
 Phe Leu His Xaa Tyr His
 1 5

<210> 49
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región conservada

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = cualquier aminoácido

<400> 49

<220>
 <223> Región conservada

 <400> 52
 His Pro Gly Gly
 1
 5

 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10

 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 15
 <400> 53
 agcacgacgs sarccacggc g 21

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 25
 <400> 54
 gtggtgcayc abcacgtgct 20

 <210> 55
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = desconocido
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> n = desconocido
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n = desconocido
 45

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(77)
 <223> n = desconocido
 50

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (302)..(302)
 <223> n = desconocido
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (639)..(639)
 <223> n = desconocido
 60

 <400> 55

ES 2 715 640 T3

	ggctgcgcaa ctnttggaag ggcgatcggg gcgggcctnt tcggtattac nccagctggc	60
	gaaaggggga tgtgctncaa ggcgattaag ttgggtaacg ccaggttttc ccagtcacga	120
	cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga attgggtacc	180
	gggccccccc tcgagaagtc gggtcgcatc ctgcggggcg acaagatctg gcagattggc	240
	tttggcagtg ggttcaagtg caactcggcc gtgtggcagg cgaacaggag cgttgagcca	300
	tntgagctcg actgacgagc tcggagctgc ggtacagaca ctgtcggcgg ctcgagaggg	360
	ctgcgacttc agacgtgacg gggagattgt gcattggtgc gccgccgggc gcggcctgcc	420
	gccccggcgc tgcacgtcat cgtcagtagt cacggtcggc atcagcgcgc ggccccgtgg	480
	tggtagctgg tagcgcaggc tgcgcagctg ccaacagccg ccgccccgagg tgggtggtgg	540
	gactccgggt gtcagtcaca ctcagtgggc gccgccggca gtaggccgtg actctgccgt	600
	ggcgtagta tcagtggcag tcagctgctg tcgtcaatnt tt	642
5	<210> 56 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de oligonucleótido	
	<400> 56 tgggttgagt actcggccaa ccacacgacc aactgcgcgc cctcgtggtg gtgcgactgg	60
	tggatgtctt acctcaacta ccagatcgag catcatctgt	100
15	<210> 57 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de oligonucleótido	
	<400> 57 atagtgcagc ccgtgcttct cgaagagcgc cttgacgcgc ggcgcgatcg tcgggtggcg	60
	gaattgcggc atggacggga acagatgatg ctcgatctgg	100
25	<210> 58 <211> 1612 <212> ADN <213> <i>Pavlova salina</i>	
30	<400> 58	

ES 2 715 640 T3

gccttctgga cgactgtcat gccgccgcgc gatagctact cgtacgccgc cccgccgtcg 60
 gcccagctgc acgaggtcga taccgccgag gagcatgata agaaggagct cgtcatcggg 120
 gaccgcgcgt acgacgtgac caactttgtg aagcgccacc cgggtggcaa gatcatcgca 180
 taccaggttg gcacagatgc gacggacgcg tacaagcagt tccatgtgcg gtctgccaag 240
 gcggacaaga tgctcaagtc gctgccttcg cggccgggtgc acaagggcta ctcgccccgc 300
 cgcgctgacc tcattgccga cttccaggag ttcaccaagc agctggaggc ggagggcatg 360
 tttgagccgt cgctgccgca cgtggcatac cgcttggcgg aggtgatcgc gatgcacgtg 420
 gccggcgccg cgctcatctg gcacgggtac accttcgcgg gcattgccat gctcggcggt 480
 gtgcagggcc gctgcggctg gctcatgcac gagggcggcc actactcgct cacgggcaac 540
 attgcttttg accgtgccat ccaagtcgcg tgctacggcc ttggctgcbg catgtcgggc 600
 gcgtggtggc gcaaccagca caacaagcac cacgcgacgc cgcagaagtt gcagcacgac 660
 gtcgacctcg acaccctccc gctcgtcgcc ttccacgagc ggatagccgc caaggtgaag 720
 agccccgca tgaaggcgtg gcttagtatg caggcgaagc tcttcgcgcc agtgaccacg 780
 ctgctggctg cgctgggctg gcagctgtac ctgcacccgc gccatatgct gcgcaccaag 840
 cactacgacg agctcgcgat gctcggcatt cgctacggcc ttgtcggcta cctcgcggcg 900
 aactacggcg cggggtacgt gctcgcgtgc tacctgctgt acgtgcagct cggcgccatg 960
 tacatcttct gcaactttgc cgtgtcgcac acacacctgc cggttgtcga gcctaacgag 1020
 cacgcaacgt ggggtggagta cggcgcgaac cacacgacca actgctcgcc ctcgtggtgg 1080
 tgcgactggt ggatgtcgta cctcaactac cagatcgagc accacctcta cccgtccatg 1140
 ccgcagttcc gccacccgaa gattgcgccg cgggtgaagc agctcttcga gaagcacggc 1200
 ctgcactacg acgtgcgtgg ctacttcgag gccatggcgg acacgtttgc caaccttgac 1260
 aacgtcgcgc acgcgccgga gaagaagatg cagtgagcgc gcgagtgagc aacgccaagc 1320
 gtccaccgcg gagtcgcccg tggctctcct gccgatcgcg gcctgtctct ccagctgaca 1380
 tctctgcttt gcttgccat gatcgacgtc gcctccctct ctctccacac gatgtgcctg 1440
 acgaatgacc tgcgggataa tcagcgtctg catgccccatg ccagcgcca tggcagctgc 1500
 tgcggcagcc gccaaagtgg aatccatgac acgctgtctc acgacgcgca cgccttccat 1560
 cttgacaatc agcatggacg tagcatcatc agttcagtga ctaattcctt tc 1612

<210> 59
 <211> 1278
 <212> ADN
 <213> *Pavlova salina*

5

<400> 59
 atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60
 gatacccgcg aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg 120
 accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180
 gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggcttgcca aggcggacaa gatgctcaag 240

ES 2 715 640 T3

tcgctgcctt cgcgcccggg gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccc 360
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480
tggctcatgc acgagggcgg cactactcgc ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540
atccaagtcg cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgctcg gcgctgggtg gcgcaaccag 600
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
ccgctcgtcg cttccacga gcggatagcc gccaaaggta agagccccgc gatgaaggcg 720
tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780
tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840
atgctcggca ttcgctacgg ccttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900
gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
gccgtgctgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
tacgccgca accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgctg 1080
tacctcaact accagatcga gcaccacctc taccgtcca tgccgcagtt ccgccaccg 1140
aagattgcmc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgctg 1200
ggctacttcg aggccatggc ggacacggtt gccaaccttg acaacgctgc gcacgcgccg 1260
gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 60
<211> 425
<212> PRT
<213> *Pavlova salina*

5

<400> 60
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

ES 2 715 640 T3

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
 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
 His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro

ES 2 715 640 T3

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

5
<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> *Echium pitardii*

10
<400> 61
Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr
1 5

15
<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> *Echium pitardii*

<400> 62
Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
1 5

20
<210> 63
<211> 1347
<212> ADN
<213> *Echium plantagineum*

<400> 63
atggctaattg caatcaagaa gtacattact gcagaggagc tgaagaagca tgataaagca 60
ggggatctct ggatctccat tcaaggaaaa atctatgatg tttcagattg gttgaaggac 120
catccagggtg ggaacttccc cttgctgagc cttgctggcc aagaggtaac tgatgcattt 180
gttgcatctt attctggtac aacttgggaag cttcttgaaa aattcttcac tggttattac 240
cttaaagatt actctgtttc tgagggtgtcc aaagattaca ggaagcttgt gtttgagttt 300
aataaaatgg gcttgtttga caaaaagggt catattgttc ttgtgactgt cttgtttata 360
gctatgttgt ttggtatgag tgtttatggg gttttgtttt gtgagggtgt tttggtacat 420
ttgcttgctg gggggttgat gggttttgtc tggattcaga gtggttggat tggatcatgat 480
gctgggcatt atattgttat gcctgatgct aggcttaata agcttatggg tattgttgct 540
gccaattggt tatctggaat aagcattggt tgggtggaat ggaaccataa tgcacatcac 600
attgcctgta atagcctcga ttacgacctg gatttgcagt acattccggt tcttgttgctg 660
tcgtccaagt tgttttagctc gctcacctct catttctatg aaaagaaact gacatttgac 720
tctttatcga gattctttgt aagccatcag cattggacgt tttaccgggt tatgtgtatg 780

ES 2 715 640 T3

gctaggggta atatgtttgt gcagtctctg ataatgttgt tgactaagcg aaatgtgttc 840
 tatagaagtc aagaactggt gggattgggtg gtgttttgga tttggtaccc gttgcttgtt 900
 tcttgcttgc ctaattgggg agaacgagta atgttcggtg ttgctagtct ctcggtgact 960
 ggaatgcaac aagtgcagtt ctctttgaac catttctcgt cgagtgttta tgttggtcag 1020
 cctaaagggg acgattgggt cgagaaacaa acatgtggga cgctcgacat ttcttgcctt 1080
 tcgtggatgg attggtttca tgggtgattg caattccaag ttgagcatca tttgttcctt 1140
 aagctgccca gatgccacct tcggaaaatc tccccgttcg tgatggagtt atgcaagaag 1200
 cataatttgt cttacaattg tgcattcttc tccgaggcca acaatatgac actcagaaca 1260
 ttaagggaca cagcattgca agctcgcgat ttaaccaagc cgctcccca gaatttggtg 1320
 tgggaagctc ttaatactca tgggttga 1347

<210> 64
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> *Echium plantagineum*

5

<400> 64
 Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ala Glu Glu Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 His Asp Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Asn Phe Pro Leu
 35 40 45
 Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60
 Ser Gly Thr Thr Trp Lys Leu Leu Glu Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110
 Val Leu Val Thr Val Leu Phe Ile Ala Met Leu Phe Gly Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
 130 135 140
 Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asp Ala Arg Leu Asn Lys Leu Met

ES 2 715 640 T3

				165						170						175
Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Asn	Cys	Leu	Ser	Gly	Ile	Ser	Ile	Gly	Trp	Trp	
			180					185					190			
Lys	Trp	Asn	His	Asn	Ala	His	His	Ile	Ala	Cys	Asn	Ser	Leu	Asp	Tyr	
		195					200					205				
Asp	Pro	Asp	Leu	Gln	Tyr	Ile	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	
	210					215					220					
Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	His	Phe	Tyr	Glu	Lys	Lys	Leu	Thr	Phe	Asp	
225					230					235					240	
Ser	Leu	Ser	Arg	Phe	Phe	Val	Ser	His	Gln	His	Trp	Thr	Phe	Tyr	Pro	
				245					250					255		
Val	Met	Cys	Met	Ala	Arg	Val	Asn	Met	Phe	Val	Gln	Ser	Leu	Ile	Met	
			260					265					270			
Leu	Leu	Thr	Lys	Arg	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Ser	Gln	Glu	Leu	Leu	Gly	
		275					280					285				
Leu	Val	Val	Phe	Trp	Ile	Trp	Tyr	Pro	Leu	Leu	Val	Ser	Cys	Leu	Pro	
	290					295					300					
Asn	Trp	Gly	Glu	Arg	Val	Met	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	
305					310					315					320	
Gly	Met	Gln	Gln	Val	Gln	Phe	Ser	Leu	Asn	His	Phe	Ser	Ser	Ser	Val	
				325					330					335		
Tyr	Val	Gly	Gln	Pro	Lys	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Glu	Lys	Gln	Thr	Cys	
			340					345					350			
Gly	Thr	Leu	Asp	Ile	Ser	Cys	Pro	Ser	Trp	Met	Asp	Trp	Phe	His	Gly	
		355					360					365				
Gly	Leu	Gln	Phe	Gln	Val	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Lys	Leu	Pro	Arg	
	370					375					380					
Cys	His	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Pro	Phe	Val	Met	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	
385					390					395					400	
His	Asn	Leu	Ser	Tyr	Asn	Cys	Ala	Ser	Phe	Ser	Glu	Ala	Asn	Asn	Met	
				405					410					415		
Thr	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Asp	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Asp	Leu	Thr	
			420					425					430			
Lys	Pro	Leu	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Trp	Glu	Ala	Leu	Asn	Thr	His	Gly	
		435					440					445				

ES 2 715 640 T3

<210> 65
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> *Echium gentianoides*

5

<400> 65
 Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ala Glu Glu Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 His Asp Lys Glu Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val Tyr
 20 25 30
 Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Lys Phe Pro Leu
 35 40 45
 Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60
 Ser Gly Ser Thr Trp Lys Phe Leu Asp Ser Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105
 Val Leu Val Thr Val Leu Phe Ile Ala Met Met Phe Ala Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
 130 135 140
 Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asn Pro Arg Leu Asn Lys Leu Met
 165 170 175
 Gly Ile Val Ala Gly Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr
 195 200 205
 Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Phe Ser Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Lys Leu Thr Phe Asp
 225 230 235 240

ES 2 715 640 T3

Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser His Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro
245 250 255

Val Met Cys Ser Ala Arg Val Asn Met Phe Val Gln Ser Leu Ile Met
260 265 270

Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Phe Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Leu Val Val Phe Trp Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
290 295 300

Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Val Ala Ser Leu Ser Val Thr
305 310 315 320

Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ala Ser Val
325 330 335

Tyr Val Gly Gln Pro Lys Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Cys
340 345 350

Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Ser Trp Met Asp Trp Phe His Gly
355 360 365

Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Lys Leu Pro Arg
370 375 380

Cys His Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Met Glu Leu Cys Lys Lys
385 390 395 400

His Asn Leu Ser Tyr Asn Cys Ala Ser Phe Ser Glu Ala Asn Glu Met
405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asp Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr
420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
435 440 445

<210> 66

<211> 448

<212> PRT

<213> *Echium pitardii*

<400> 66

Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ala Glu Glu Leu Lys Lys
1 5 10 15

His Asp Lys Glu Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val Tyr
20 25 30

Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Lys Phe Pro Leu
35 40 45

5

ES 2 715 640 T3

Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60
 Ser Gly Ser Thr Trp Lys Leu Leu Asp Ser Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105
 Val Leu Val Thr Val Phe Phe Ile Ala Met Met Phe Ala Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
 130 135 140
 Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asn Pro Lys Leu Asn Lys Leu Met
 165 170 175
 Gly Ile Val Ala Ser Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr
 195 200 205
 Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Phe Ser Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Lys Leu Thr Phe Asp
 225 230 235 240
 Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser His Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Val Met Cys Ser Ala Arg Val Asn Met Phe Val Gln Ser Leu Ile Met
 260 265 270
 Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Phe Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Val Val Phe Trp Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
 290 295 300
 Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Val Ala Ser Leu Ser Val Thr
 305 310 315 320

ES 2 715 640 T3

Gly Leu Gln Gln Val 325 Gln Phe Ser Leu Asn 330 His Phe Ala Ala Ser 335 Val

Tyr Val Gly Gln 340 Pro Lys Gly Ile Asp 345 Trp Phe Glu Lys Gln 350 Thr Cys

Gly Thr Leu 355 Asp Ile Ser Cys Pro 360 Ser Trp Met Asp Trp 365 Phe His Gly

Gly Leu Gln Phe Gln Val 375 Glu His His Leu Phe Pro 380 Lys Leu Pro Arg

Cys 385 His Leu Arg Lys Ile 390 Ser Pro Phe Val Met 395 Glu Leu Cys Lys Lys 400

His Asn Leu Ser Tyr 405 Asn Cys Ala Ser Phe 410 Ser Gln Ala Asn Glu 415 Met

Thr Leu Arg Thr 420 Leu Arg Asp Thr Ala 425 Leu Gln Ala Arg Asp 430 Leu Thr

Lys Pro Leu 435 Pro Lys Asn Leu Val 440 Trp Glu Ala Leu Asn 445 Thr His Gly

<210> 67
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> *Boago officinalis*

5

<400> 67
 Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15

His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr
 20 25 30

Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu
 35 40 45

Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60

Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80

Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95

Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110

Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val

ES 2 715 640 T3

	115						120							125	
Tyr	Gly 130	Val	Leu	Phe	Cys	Glu 135	Gly	Val	Leu	Val	His 140	Leu	Phe	Ser	Gly
Cys	Leu	Met	Gly	Phe	Leu 150	Trp	Ile	Gln	Ser	Gly 155	Trp	Ile	Gly	His	Asp 160
Ala	Gly	His	Tyr	Met 165	Val	Val	Ser	Asp	Ser 170	Arg	Leu	Asn	Lys	Phe 175	Met
Gly	Ile	Phe	Ala 180	Ala	Asn	Cys	Leu	Ser 185	Gly	Ile	Ser	Ile	Gly 190	Trp	Trp
Lys	Trp	Asn 195	His	Asn	Ala	His	His 200	Ile	Ala	Cys	Asn	Ser 205	Leu	Glu	Tyr
Asp	Pro 210	Asp	Leu	Gln	Tyr	Ile 215	Pro	Phe	Leu	Val	Val 220	Ser	Ser	Lys	Phe
Phe	Gly 225	Ser	Leu	Thr	Ser 230	His	Phe	Tyr	Glu	Lys 235	Arg	Leu	Thr	Phe	Asp 240
Ser	Leu	Ser	Arg	Phe 245	Phe	Val	Ser	Tyr	Gln 250	His	Trp	Thr	Phe	Tyr 255	Pro
Ile	Met	Cys	Ala 260	Ala	Arg	Leu	Asn	Met 265	Tyr	Val	Gln	Ser	Leu	Ile	Met
Leu	Leu	Thr 275	Lys	Arg	Asn	Val	Ser 280	Tyr	Arg	Ala	His	Glu 285	Leu	Leu	Gly
Cys	Leu 290	Val	Phe	Ser	Ile	Trp 295	Tyr	Pro	Leu	Leu	Val 300	Ser	Cys	Leu	Pro
Asn	Trp 305	Gly	Glu	Arg	Ile 310	Met	Phe	Val	Ile	Ala 315	Ser	Leu	Ser	Val	Thr 320
Gly	Met	Gln	Gln	Val 325	Gln	Phe	Ser	Leu	Asn 330	His	Phe	Ser	Ser	Ser 335	Val
Tyr	Val	Gly	Lys 340	Pro	Lys	Gly	Asn	Asn 345	Trp	Phe	Glu	Lys	Gln 350	Thr	Asp
Gly	Thr	Leu 355	Asp	Ile	Ser	Cys	Pro 360	Pro	Trp	Met	Asp	Trp 365	Phe	His	Gly
Gly	Leu 370	Gln	Phe	Gln	Ile	Glu 375	His	His	Leu	Phe	Pro 380	Lys	Met	Pro	Arg
Cys	Asn	Leu	Arg	Lys	Ile 390	Ser	Pro	Tyr	Val	Ile 395	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys 400

ES 2 715 640 T3

His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met
 405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr
 420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly
 435 440 445

<210> 68
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Boago officinalis*

5

<400> 68
 Met Glu Gly Thr Lys Lys Tyr Ile Ser Val Gly Glu Leu Glu Lys His
 1 5 10 15

Asn Gln Leu Gly Asp Val Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val Tyr Asn
 20 25 30

Val Thr Asp Trp Ile Lys Lys His Pro Gly Gly Asp Val Pro Ile Met
 35 40 45

Asn Leu Ala Gly Gln Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ile Ala Tyr His Pro
 50 55 60

Gly Thr Ala Trp Lys Asn Leu Glu Asn Leu Phe Thr Gly Tyr His Leu
 65 70 75 80

Glu Asp Tyr Leu Val Ser Glu Ile Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu Ala
 85 90 95

Ser Glu Phe Ser Lys Ala Gly Leu Phe Glu Lys Lys Gly His Thr Val
 100 105 110

Ile Tyr Cys Leu Ser Phe Ile Ala Leu Leu Leu Cys Gly Cys Val Tyr
 115 120 125

Gly Val Leu Cys Ser Asn Ser Leu Trp Val His Met Leu Ser Gly Ala
 130 135 140

Met Leu Gly Met Cys Phe Ile Gln Ala Ala Tyr Leu Gly His Asp Ser
 145 150 155 160

Gly His Tyr Thr Met Met Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Phe Ala Gln
 165 170 175

Val Leu Asn Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys
 180 185 190

ES 2 715 640 T3

Trp Thr His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr Asp
 195 200 205

Pro Asp Leu Gln His Leu Pro Val Phe Ala Val Pro Ser Ser Phe Phe
 210 215 220

Lys Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Gly Arg Glu Leu Thr Phe Asp Gly
 225 230 235 240

Leu Ser Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr Ile Tyr Leu Val
 245 250 255

Met Ile Phe Gly Arg Ile Asn Leu Tyr Val Gln Thr Phe Leu Leu Leu
 260 265 270

Phe Ser Thr Arg Lys Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Ile Ile Gly Ile
 275 280 285

Leu Val Tyr Trp Thr Trp Phe Pro Tyr Leu Val Ser Cys Leu Pro Asn
 290 295 300

Trp Asn Glu Arg Val Leu Phe Val Leu Thr Cys Phe Ser Val Thr Ala
 305 310 315 320

Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala Ala Asp Val Tyr
 325 330 335

Val Gly Pro Pro Thr Gly Thr Asn Trp Phe Glu Lys Gln Ala Ala Gly
 340 345 350

Thr Ile Asp Ile Ser Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly
 355 360 365

Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro Arg Cys
 370 375 380

Gln Leu Arg Asn Ile Ser Pro Ile Val Gln Asp Tyr Cys Lys Lys His
 385 390 395 400

Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Leu Ser Phe Phe Asp Ala Asn Val Ala Thr
 405 410 415

Ile Lys Thr Leu Arg Thr Ala Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr Val
 420 425 430

Val Pro Gln Asn Leu Leu Trp Glu Ala Phe Asn Thr His Gly
 435 440 445

<210> 69
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> *Helianthus annuus*

5

<400> 69

ES 2 715 640 T3

Met Val Ser Pro Ser Ile Glu Val Leu Asn Ser Ile Ala Asp Gly Lys
1 5 10 15

Lys Tyr Ile Thr Ser Lys Glu Leu Lys Lys His Asn Asn Pro Asn Asp
20 25 30

Leu Trp Ile Ser Ile Leu Gly Lys Val Tyr Asn Val Thr Glu Trp Ala
35 40 45

Lys Glu His Pro Gly Gly Asp Ala Pro Leu Ile Asn Leu Ala Gly Gln
50 55 60

Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Phe His Pro Gly Thr Ala Trp Lys
65 70 75 80

His Leu Asp Lys Leu Phe Thr Gly Tyr His Leu Lys Asp Tyr Gln Val
85 90 95

Ser Asp Ile Ser Arg Asp Tyr Arg Lys Leu Ala Ser Glu Phe Ala Lys
100 105 110

Ala Gly Met Phe Glu Lys Lys Gly His Gly Val Ile Tyr Ser Leu Cys
115 120 125

Phe Val Ser Leu Leu Leu Ser Ala Cys Val Tyr Gly Val Leu Tyr Ser
130 135 140

Gly Ser Phe Trp Ile His Met Leu Ser Gly Ala Ile Leu Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Met Gln Ile Ala Tyr Leu Gly His Asp Ala Gly His Tyr Gln Met
165 170 175

Met Ala Thr Arg Gly Trp Asn Lys Phe Ala Gly Ile Phe Ile Gly Asn
180 185 190

Cys Ile Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys Trp Thr His Asn Ala
195 200 205

His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His
210 215 220

Leu Pro Met Leu Ala Val Ser Ser Lys Leu Phe Asn Ser Ile Thr Ser
225 230 235 240

Val Phe Tyr Gly Arg Gln Leu Thr Phe Asp Pro Leu Ala Arg Phe Phe
245 250 255

Val Ser Tyr Gln His Tyr Leu Tyr Tyr Pro Ile Met Cys Val Ala Arg
260 265 270

ES 2 715 640 T3

Val Asn Leu Tyr Leu Gln Thr Ile Leu Leu Leu Ile Ser Lys Arg Lys
 275 280 285

Ile Pro Asp Arg Gly Leu Asn Ile Leu Gly Thr Leu Ile Phe Trp Thr
 290 295 300

Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Arg Leu Pro Asn Trp Pro Glu Arg Val
 305 310 315 320

Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Cys Val Thr Gly Ile Gln His Ile Gln
 325 330 335

Phe Thr Leu Asn His Phe Ser Gly Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys
 340 345 350

Gly Asp Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Arg Gly Thr Ile Asp Ile Ala
 355 360 365

Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu
 370 375 380

Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro Arg Cys His Leu Arg Ser Ile
 385 390 395 400

Ser Pro Ile Cys Arg Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr Val
 405 410 415

Ser Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Asn Val Thr Thr Leu Lys Thr Leu Arg
 420 425 430

Thr Ala Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr Asn Pro Ala Pro Gln Asn
 435 440 445

Leu Ala Trp Glu Ala Phe Asn Thr His Gly
 450 455

<210> 70
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 70
 Met Ala Asp Gln Thr Lys Lys Arg Tyr Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys
 1 5 10 15

Lys His Asn Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val
 20 25 30

Tyr Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Ser His Pro Gly Gly Glu Ala Ala
 35 40 45

Ile Leu Asn Leu Ala Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Tyr

ES 2 715 640 T3

Val Tyr Thr Gly Pro Pro Asn Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr
340 345 350

Ala Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Arg Ser Phe Met Asp Trp Phe Phe
355 360 365

Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro
370 375 380

Arg Cys His Leu Arg Thr Val Ser Pro Val Val Lys Glu Leu Cys Lys
385 390 395 400

Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Leu Ser Trp Trp Glu Ala Asn Val
405 410 415

Trp Thr Ile Arg Thr Leu Lys Asn Ala Ala Ile Gln Ala Arg Asp Ala
420 425 430

Thr Asn Pro Val Leu Lys Asn Leu Leu Trp Glu Ala Val Asn Thr His
435 440 445

Gly

<210> 71

<211> 449

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 71

Met Ala Glu Glu Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Thr Asn Glu Asp Leu Lys
1 5 10 15

Lys His Asn Lys Ser Gly Asp Leu Trp Ile Ala Ile Gln Gly Lys Val
20 25 30

Tyr Asn Val Ser Asp Trp Ile Lys Thr His Pro Gly Gly Asp Thr Val
35 40 45

Ile Leu Asn Leu Val Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Phe
50 55 60

His Pro Gly Thr Ala Trp His His Leu Asp His Leu Phe Thr Gly Tyr
65 70 75 80

His Ile Arg Asp Phe Gln Val Ser Glu Val Ser Arg Asp Tyr Arg Arg
85 90 95

Met Ala Ala Glu Phe Arg Lys Leu Gly Leu Phe Glu Asn Lys Gly His
100 105 110

5

ES 2 715 640 T3

Val Thr Leu Tyr Thr Leu Ala Phe Val Ala Ala Met Phe Leu Gly Val
 115 120 125
 Leu Tyr Gly Val Leu Ala Cys Thr Ser Val Phe Ala His Gln Ile Ala
 130 135 140
 Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Ile Gly His
 145 150 155 160
 Asp Ser Gly His Tyr Val Ile Met Ser Asn Lys Ser Tyr Asn Arg Phe
 165 170 175
 Ala Gln Leu Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp
 180 185
 Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser Leu Asp
 195 200 205
 Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Phe Ala Val Ser Thr Lys
 210 215 220
 Phe Phe Ser Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Arg Lys Leu Thr Phe
 225 230 235 240
 Asp Pro Val Ala Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr Tyr Tyr
 245 250 255
 Pro Val Met Cys Phe Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr Phe Leu
 260 265 270
 Leu Leu Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Phe Ala
 275 280 285
 Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu
 290 295 300
 Pro Asn Trp Pro Glu Arg Phe Phe Phe Val Phe Thr Ser Phe Thr Val
 305 310 315 320
 Thr Ala Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala Ala Asp
 325 330 335
 Val Tyr Val Gly Pro Pro Thr Gly Ser Asp Trp Phe Glu Lys Gln Ala
 340 345 350
 Ala Gly Thr Ile Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp Phe Phe
 355 360 365
 Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro
 370 375 380
 Arg Cys His Leu Arg Lys Val Ser Pro Val Val Gln Glu Leu Cys Lys

ES 2 715 640 T3

Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala
 20 25 30

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu
 35 40 45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr
 50 55 60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His
 65 70 75 80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser
 85 90 95

Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr
 100 105 110

Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe
 115 120 125

Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val
 130 135 140

Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr
 145 150 155 160

Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr
 165 170 175

Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr
 180 185 190

Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln
 195 200 205

Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp
 210 215 220

His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val
 225 230 235 240

Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
 260 265 270

<210> 75
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> *Dabio rerio*

<400> 75

ES 2 715 640 T3

Met Ser Val Leu Ala Leu Gln Glu Tyr Glu Phe Glu Arg Gln Phe Asn
 1 5 10 15

Glu Asp Glu Ala Ile Arg Trp Met Gln Glu Asn Trp Lys Lys Ser Phe
 20 25 30

Leu Phe Ser Ala Leu Tyr Ala Ala Cys Ile Leu Gly Gly Arg His Val
 35 40 45

Met Lys Gln Arg Glu Lys Phe Glu Leu Arg Lys Pro Leu Val Leu Trp
 50 55 60

Ser Leu Thr Leu Ala Ala Phe Ser Ile Phe Gly Ala Ile Arg Thr Gly
 65 70 75 80

Gly Tyr Met Val Asn Ile Leu Met Thr Lys Gly Leu Lys Gln Ser Val
 85 90 95

Cys Asp Gln Ser Phe Tyr Asn Gly Pro Val Ser Lys Phe Trp Ala Tyr
 100 105 110

Ala Phe Val Leu Ser Lys Ala Pro Glu Leu Gly Asp Thr Leu Phe Ile
 115 120 125

Val Leu Arg Lys Gln Lys Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr His His Ile
 130 135 140

Thr Val Leu Leu Tyr Ser Trp Tyr Ser Tyr Lys Asp Met Val Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Trp Phe Met Thr Met Asn Tyr Leu Val His Ala Val Met Tyr
 165 170 175

Ser Tyr Tyr Ala Leu Arg Ala Ala Gly Phe Lys Ile Ser Arg Lys Phe
 180 185 190

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

Val Val Asn Tyr Leu Val Tyr Leu Trp Met Gln Gln Gly Gln Glu Cys
 210 215 220

Pro Ser His Val Gln Asn Ile Val Trp Ser Ser Leu Met Tyr Leu Ser
 225 230 235 240

Tyr Phe Val Leu Phe Cys Gln Phe Phe Phe Glu Ala Tyr Ile Thr Lys
 245 250 255

Arg Lys Ser Asn Ala Ala Lys Lys Ser Gln
 260 265

<210> 76
 <211> 320

ES 2 715 640 T3

<212> PRT

<213> *Pavlova lutheri*

<400> 76

His Glu Ala Ser Cys Arg Ile Arg His Glu Ala Ala Leu Trp Ser Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Tyr Asp Glu Phe Val Asp Gly Leu Ser Phe Val Asp Arg
 20 25 30
 Glu Lys Ile Gly Val His Met Val Asp Gln Gly Val Ile Thr Ser Ala
 35 40 45
 Glu Trp Ala Ala Ile Ser Val Asp Lys His Met Ser Phe Phe Ser Asp
 50 55 60
 Ala Ala Glu Phe Thr Gly Asp His Trp Ile Ile Pro Leu Val Ala Val
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Leu Val Met Ile Val Val Gly Pro Met Ile Met Ala Asn
 85 90
 Arg Pro Pro Leu Pro Val Asn Gly Leu Ala Cys Ala Trp Asn Trp Phe
 100 105 110
 Leu Ala Ala Phe Ser Thr Phe Gly Val Ala Cys Thr Trp His Cys Ile
 115 120 125
 Phe Thr Arg Leu Arg Ser Arg Gly Phe Glu Ser Thr Thr Cys Gly Ser
 130 135 140
 Ala Met Phe Met Ser Gln Gly Tyr Val Gly Leu Ala Met Leu Leu Phe
 145 150 155 160
 Ile Tyr Ser Lys Leu Phe Glu Leu Ile Asp Thr Phe Phe Leu Ile Ala
 165 170 175
 Lys Lys Ala Asp Val Ile Phe Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val
 180 185 190
 Leu Leu Tyr Cys Trp His Ser His Ser Val Arg Ile Pro Ser Gly Ile
 195 200 205
 Trp Phe Ala Ala Met Asn Tyr Phe Val His Ala Ile Met Tyr Ser Tyr
 210 215 220
 Phe Ala Met Thr Gln Met Gly Pro Arg Tyr Arg Lys Leu Val Arg Pro
 225 230 235 240
 Tyr Ala Arg Leu Ile Thr Thr Leu Gln Ile Ser Gln Met Phe Val Gly

5

ES 2 715 640 T3

245 250 255
 Leu Ile Val Asn Gly Ser Ile Ile Tyr Phe Thr Ser Leu Gly His Ala
 260 265 270
 Cys Lys Ser Ser Lys Thr Asn Thr Ile Leu Ser Trp Leu Met Tyr Leu
 275 280 285
 Ser Tyr Phe Val Leu Phe Gly Leu Leu Tyr Leu Arg Asn Tyr Ile Leu
 290 295 300
 Gly Thr His Gly Lys Pro Ala Gly Lys Arg Ala Lys Gly Lys Ala Glu
 305 310 315 320
 <210> 77
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*
 <400> 77
 Met Glu Thr Phe Ser His Arg Val Asn Ser Tyr Ile Asp Ser Trp Met
 1 5 10 15
 Gly Pro Arg Asp Leu Arg Val Thr Gly Trp Phe Leu Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ile Pro Thr Phe Ile Phe Thr Val Met Tyr Leu Leu Ile Val Trp Met
 35 40 45
 Gly Pro Lys Tyr Met Lys Asn Arg Gln Ala Tyr Ser Cys Arg Ala Leu
 50 55 60
 Leu Val Pro Tyr Asn Leu Cys Leu Thr Leu Leu Ser Leu Tyr Met Phe
 65 70 75 80
 Tyr Glu Leu Val Met Ser Val Tyr Gln Gly Gly Tyr Asn Phe Phe Cys
 85 90 95
 Gln Asn Thr His Ser Gly Gly Asp Ala Asp Asn Arg Met Met Asn Val
 100 105 110
 Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Ile Glu Phe Met Asp Thr Phe
 115 120 125
 Phe Phe Ile Leu Arg Lys Asn Asn His Gln Ile Thr Phe Leu His Val
 130 135 140
 Tyr His His Ala Thr Met Leu Asn Ile Trp Trp Phe Val Met Asn Trp
 145 150 155 160
 Val Pro Cys Gly His Ser Tyr Phe Gly Ala Thr Phe Asn Ser Phe Ile
 165 170 175

ES 2 715 640 T3

His Val Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Val Pro Ala Leu
180 185 190

Arg Pro Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Gln Gly Gln Leu Val
195 200 205

Gln Phe Val Leu Thr Met Phe Gln Thr Ser Cys Ala Val Val Trp Pro
210 215 220

Cys Gly Phe Pro Met Gly Trp Leu Tyr Phe Gln Ile Ser Tyr Met Val
225 230 235 240

Thr Leu Ile Leu Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Ile Gln Thr Tyr Lys Lys
245 250 255

Arg Ser Gly Ser Val Asn Gly His Thr Asn Gly Val Met Ser Ser Glu
260 265 270

Lys Ile Lys His Arg Lys Ala Arg Ala Asp
275 280

<210> 78

<211> 396

<212> PRT

<213> *Pavlova lutheri*

<400> 78

Arg Gly Leu Val Pro Asn Ser Ala Arg Gly Leu Arg Asp Asp Lys Asp
1 5 10 15

Asp Gly Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asp Phe Phe Arg Ser Thr Ile Thr
20 25 30

Asp Cys Gly Asn Phe Cys Asp Glu Ser Val Asp Phe Gln Met Lys Leu
35 40 45

Phe Glu Arg Asn Gln Ile Ser Glu Arg Cys Tyr Phe Pro Pro Gly Ile
50 55 60

Arg Ala Tyr Arg Lys Gly Glu Arg Asp Phe Asp Phe Ser Met Ala Ala
65 70 75 80

Ala Arg Lys Glu Phe Glu Thr Val Val Phe Thr Thr Val Asp Glu Leu
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Gly Val Lys Pro Arg Asp Ile Asp Ile Leu Val Val
100 105 110

Asn Cys Ser Leu Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ala Ala Ile Val Ile
115 120 125

Asn His Tyr Gln Met Lys Asp Ser Val Gln Ser Tyr Ser Leu Gly Gly

5

ES 2 715 640 T3

130 135 140

Met Gly Cys Ser Ala Gly Leu Ile Ser Ile His Leu Ala Lys Asp Leu
 145 150 155 160

Leu Gln Val Tyr Pro Arg Lys Arg Ala Leu Val Ile Ser Thr Glu Asn
 165 170 175

Ile Thr Gln Asn Phe Tyr Gln Gly Asn Glu Lys Ser Met Leu Ile Ser
 180 185 190

Asn Thr Leu Phe Arg Met Gly Gly Ala Ala Val Leu Leu Ser Gly Arg
 195 200 205

His Ala Asp Arg Arg Val Ala Lys Tyr Gln Leu Leu His Thr Val Arg
 210 215 220

Thr His Lys Gly Ala Asp Pro Asp Ala Tyr Arg Cys Val Phe Gln Glu
 225 230 235 240

Glu Asp Lys Ala Gly His Val Gly Val Arg Leu Ser Lys Asp Val Met
 245 250 255

Glu Cys Ala Gly Ala Ala Met Lys Thr Asn Ile Ser Val Leu Ala Pro
 260 265 270

Leu Ile Leu Pro Val Ser Glu Gln Val Arg Phe Leu Ala Asn Tyr Val
 275 280 285

Ala Arg Lys Trp Leu Arg Met Lys Gly Val Lys Gly Tyr Val Pro Asp
 290 295 300

Phe Thr Thr Ala Val Gln His Phe Cys Ile His Thr Gly Gly Arg Ala
 305 310 315 320

Val Leu Asp Ala Leu Gln Ala Asn Leu Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Leu
 325 330 335

Glu Pro Ser Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Trp Gly Asn Val Ser Ser Ala
 340 345 350

Ser Val Trp Tyr Glu Leu Asp Trp Leu Glu Lys Ser Gly Arg Ile Arg
 355 360 365

Arg Gly Asp Lys Val Trp Gln Ile Gly Phe Gly Ser Gly Phe Lys Cys
 370 375 380

Asn Ser Ala Val Trp Arg Ala Cys Arg Ala Met Pro
 385 390 395

<210> 79
 <211> 315
 <212> ADN

ES 2 715 640 T3

<213> *Heterocapsa niei*

<400> 79

gattcaggat cttttttgca taggtaccac tccaccatgt ttccgatctg gtagggttgt 60
 gtgCGTggTc cacgcctctt cacttgGaca agtgccgTcg ggccaagtgc cgtcgggcca 120
 agtgccgTcg ggccaaggaa agcactccag cgctcacaac cacctcaccC cccctcccG 180
 cccccgctt cgttttcgct tgctttcagg tggatggggg cccgctgggt gcctggaggc 240
 cagtcgtatt tttgtgcgac catcaattcc accgtgcatg ttgtcatgta cgcctattac 300
 ttttctagat caatc 315

5

<210> 80

<211> 100

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Proteína codificada por SEQ ID NO:79 que comprende un codón de detención entre los restos 17 y 18 sugiriendo la presencia de un intrón

15

<400> 80

Asp Ser Gly Ser Phe Leu His Arg Tyr His Ser Thr Met Phe Pro Ile
 1 5 10 15

Trp Gly Cys Val Arg Gly Pro Arg Leu Phe Thr Trp Thr Ser Ala Val
 20 25 30

Gly Pro Ser Ala Val Gly Pro Ser Ala Val Gly Pro Arg Lys Ala Leu
 35 40 45

Gln Arg Ser Gln Pro Pro His Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ala Ser Phe
 50 55 60

Ser Leu Ala Phe Arg Trp Met Gly Ala Arg Trp Val Pro Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Ser Tyr Phe Cys Ala Thr Ile Asn Ser Thr Val His Val Val Met Tyr
 85 90 95

Ala Tyr Tyr Phe
 100

<210> 81

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido

25

<400> 81

gctacgccccg gggatcctcg aggctggcgc aacgcaatta atgtga 46

30

<210> 82

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 715 640 T3

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<400> 82
 cacaggaaac agcttgacat cgattaccgg caattgtacg gcggccgcta cggatatacct 60
 5 cgctcgagct cgcccggggt agct 84

<210> 83
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<400> 83
 agcacatcga tgaaggagat ataccatgg ctaatgcaat caagaa 46
 15

<210> 84
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<400> 84
 acgatgcggc cgctcaacca tgagtattaa gagctt 36
 25

<210> 85
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> *Pavlova salina*

<400> 85
 Met Pro Thr Trp Gly Glu Phe Val Ala Gly Leu Thr Tyr Val Glu Arg
 1 5 10 15
 Gln Gln Met Ser Glu Glu Leu Val Arg Ala Asn Lys Leu Pro Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Phe Thr Ile Ala Ser Val Tyr Val Gly
 35 40 45
 Asp His Trp Arg Ile Pro Phe Thr Ala Ile Ser Ala Tyr Leu Val Leu
 50 55 60
 Ile Thr Leu Gly Pro Gln Leu Met Ala Arg Arg Pro Pro Leu Pro Ile
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Ala Cys Leu Trp Asn Phe Ala Leu Ser Leu Phe Ser Phe
 85 90 95
 35 Val Gly Met Ile Val Thr Trp Thr Thr Ile Gly Glu Arg Leu Trp Lys

ES 2 715 640 T3

100 105 110
 Asn Gly Ile Glu Asp Thr Val Cys Gly His Pro Ile Phe Met Gly Tyr
 115 120 125
 Gly Trp Ile Gly Tyr Val Met Leu Ala Phe Ile Trp Ser Lys Leu Phe
 130 135 140
 Glu Leu Ile Asp Thr Val Phe Leu Val Ala Lys Lys Ala Asp Val Ile
 145 150 155 160
 Phe Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Tyr Cys Trp His
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Val Arg Ile Pro Ser Gly Ile Trp Phe Ala Ala Met Asn
 180 185 190
 Tyr Phe Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Phe Gly Met Thr Gln Ile
 195 200 205
 Gly Pro Arg Gln Arg Lys Leu Val Arg Pro Tyr Ala Arg Leu Ile Thr
 210 215 220
 Thr Phe Gln Leu Ser Gln Met Gly Val Gly Leu Ala Val Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Ile Ile Arg Tyr Pro Ser Ile Gly His His Cys His Ser Asn Lys Thr
 245 250 255
 Asn Thr Ile Leu Ser Trp Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Val Leu Phe
 260 265 270
 Ala Ala Leu Tyr Val Lys Asn Tyr Ile Phe Ser Lys Leu Lys Ser Pro
 275 280 285
 Lys Arg Lys Lys Val Glu
 290

<210> 86
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> *Pavlova salina*

<400> 86
 Met Ser Glu Glu Leu Val Arg Ala Asn Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Pro Glu Val Asp Phe Phe Thr Ile Ala Ser Val Tyr Val Gly Asp His
 20 25 30

Trp Arg Ile Pro Phe Thr Ala Ile Ser Ala Tyr Leu Val Leu Ile Thr
 35 40 45

5

ES 2 715 640 T3

Leu Gly Pro Gln Leu Met Ala Arg Arg Pro Pro Leu Pro Ile Asn Thr
 50 55 60

Leu Ala Cys Leu Trp Asn Phe Ala Leu Ser Leu Phe Ser Phe Val Gly
 65 70 75 80

Met Ile Val Thr Trp Thr Thr Ile Gly Glu Arg Leu Trp Lys Asn Gly
 85 90 95

Ile Glu Asp Thr Val Cys Gly His Pro Ile Phe Met Gly Tyr Gly Trp
 100 105 110

Ile Gly Tyr Val Met Leu Ala Phe Ile Trp Ser Lys Leu Phe Glu Leu
 115 120 125

Ile Asp Thr Val Phe Leu Val Ala Lys Lys Ala Asp Val Ile Phe Leu
 130 135 140

His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Tyr Cys Trp His Ser Tyr
 145 150 155 160

Ala Val Arg Ile Pro Ser Gly Ile Trp Phe Ala Ala Met Asn Tyr Phe
 165 170 175

Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Phe Gly Met Thr Gln Ile Gly Pro
 180 185 190

Arg Gln Arg Lys Leu Val Arg Pro Tyr Ala Arg Leu Ile Thr Thr Phe
 195 200 205

Gln Leu Ser Gln Met Gly Val Gly Leu Ala Val Asn Gly Leu Ile Ile
 210 215 220

Arg Tyr Pro Ser Ile Gly His His Cys His Ser Asn Lys Thr Asn Thr
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Trp Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Val Leu Phe Ala Ala
 245 250 255

Leu Tyr Val Lys Asn Tyr Ile Phe Ser Lys Leu Lys Ser Pro Lys Arg
 260 265 270

Lys Lys Val Glu
 275

<210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

<400> 87

5

10

cgctctagaa ctagtggatc

20

5

<210> 88
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Melosira* sp.

<400> 88

Thr Ile Phe Lys Ser Asn Ala Val Pro Ala Leu Asp Pro Tyr Pro Ile
 1 5 10 15
 Lys Phe Val Tyr Asn Val Ser Gln Ile Met Met Cys Ala Tyr Met Thr
 20 25 30
 Ile Glu Ala Gly Leu Val Ala Tyr Arg Ser Gly Tyr Thr Val Met Pro
 35 40 45
 Cys Asn Asp Tyr Asn Thr Asn Asn Pro Pro Val Gly Asn Leu Leu Trp
 50 55 60
 Leu Phe Tyr Ile Ser Lys Val Trp Asp Phe Trp Asp Thr Ile Phe Ile
 65 70 75 80
 Val Ile Gly Lys Lys Trp Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His
 85 90 95
 His Thr Thr Ile Phe Leu Phe Tyr Trp Leu Asn Ser His Val Asn Tyr
 100 105 110
 Asp Gly Asp Ile Tyr Leu Thr Ile Leu Leu Asn Gly Phe Ile His Thr
 115 120 125
 Val Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Cys Met His Thr Lys Val Pro Glu
 130 135 140
 Thr Gly Lys Ser Leu Pro Ile Trp Trp Lys Ser Ser Leu Thr Met Met
 145 150 155 160
 Gln Met Ile Gln Phe Val Thr Met Met Ser Gln Ala Ser Tyr Leu Leu
 165 170 175
 Val Thr Asn Cys Glu Lys Thr Ser Arg Gly Val Val Ile Ala Tyr Phe
 180 185 190
 Val Tyr Ile Phe Thr Leu Leu Val Leu Phe Ala Gln Phe Phe Arg Ala
 195 200 205
 Ser Tyr Met Lys Pro Lys Gly Lys Lys Ala Lys Met Lys Lys Val
 210 215 220

10

<210> 89
 <211> 683
 <212> ADN
 <213> *Melosira* sp.

15

ES 2 715 640 T3

<400> 89
 acgatcttca agtcaaacgc cgtccctgcc ctggatccat accccatcaa attcgtttac 60
 aatgtgtccc agatcatgat gtgcgcgtac atgacgatcg aggcaggcct ggtggcctac 120
 cgcagtggtc atactgtcat gccatgcaac gactacaaca ccaacaaccc ccctgtcggg 180
 aacctgctgt ggctgtttta catttccaaa gtttgggact tttgggacac catctttatc 240
 gtgattggca aaaagtggaa gcagctgagc ttcttgacagc tgtaccacca caccaccatc 300
 tttttgttct actggctcaa ctcgcatgtc aactacgacg gagatattta tctgacgatt 360
 ctgttgaacg gcttcatcca caccgtcatg tacacttatt acttcgtttg catgcacacg 420
 aaggtgcccg agactggaaa gtcgttgccc atttggtgga aatccagtct caccatgatg 480
 caaatgatcc aattcgtcac catgatgagc caggcttcgt acttgctcgt gacgaactgc 540
 gaaaagacca gtcgggggggt cgttattgcg tactttgtgt acattttcac tctactcgtc 600
 ttatttgctc agttcttccg agcatcttac atgaagccca agggaaagaa ggcgaaaatg 660
 aagaaggtat aagctgctgg cat 683

REIVINDICACIONES

1. Una célula vegetal recombinante que sintetiza ácido docosapentaenoico (DPA) a partir de ácido α -linolénico (ALA), que comprende uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:
- 5 - una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional,
- en donde el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en donde la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte ácido eicosapentaenoico (EPA) en DPA.
- 10
2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos una de las enzimas es una desaturasa que es capaz de actuar sobre un sustrato de acil-CoA.
- 15
3. La célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha célula sintetiza ácido docosahexaenoico (DHA), y las enzimas codificadas por el uno o más polinucleótidos comprenden además una $\Delta 4$ desaturasa.
4. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que
- 20 (i) el ácido graso total de la célula comprende al menos el 2,5 % de $\omega 3$ C20 LC-PUFA, y/o
- (ii) al menos 50 % del LC-PUFA que se produce en dicha célula se incorpora en triacilglicérol, y/o
- (iii) el ácido graso total de la parte de planta comprende al menos el 0,1 %, al menos el 0,13 % o al menos el 0,5 % de DPA, y/o
- (iv) la eficiencia de la conversión de EPA en DPA en la célula es al menos del 7 %.
- 25
5. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha célula también es capaz de sintetizar EPA, y en donde el ácido graso total de la célula comprende al menos el 1,5 %, al menos el 2,1 % o al menos el 2,5 % de EPA, y/o la eficiencia de la conversión de ALA en EPA en la célula es al menos del 2 % o al menos del 14,6 %.
- 30
6. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha $\Delta 5$ elongasa está codificada por:
- i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO:2;
- 35 ii) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; O
- iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60 % idéntica a SEQ ID NO:2, y en donde el polipéptido tiene actividad $\Delta 5$ elongasa.
- 40
7. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula es una célula vegetal de una angiosperma, una planta oleaginosa o una célula en una semilla.
8. La célula de la reivindicación 7, en la que al menos un promotor es un promotor específico de semilla.
- 45
9. Una semilla transgénica que comprende una célula vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el ácido graso total de la semilla comprende DPA.
10. La semilla de la reivindicación 9, en donde dicha semilla no comprende un transgén que codifica una enzima que convierte preferentemente un $\omega 6$ LC-PUFA en un $\omega 3$ LC-PUFA.
- 50
11. La semilla de las reivindicaciones 9 o 10, en donde la semilla es de una planta oleaginosa seleccionada de *Brassicas*, colza oleaginosa, maíz, girasol, soja, sorgo, lino, remolacha azucarera, algodón, cacahuate, amapola, mostaza, ricino, sésamo, alazor o plantas que producen nueces.
- 55
12. La semilla de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la planta oleaginosa es del género *Brassica*.
13. La semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la semilla deriva de una semilla isogénica no transgénica que comprende una mayor concentración de ALA que de ácido linoleico (LA) en sus ácidos grasos.
- 60
14. La semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde la semilla deriva de una semilla isogénica no transgénica que comprende al menos el 13 % de ALA en su ácido graso.
- 65
15. Una planta transgénica que comprende una célula vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
16. Una composición que comprende una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la

semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 o la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 15, y un vehículo adecuado.

5 17. Un método para producir DPA, comprendiendo el método cultivar, en condiciones adecuadas, una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10 18. Un método para producir aceite que comprende DPA, que comprende obtener la semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, o a planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 15, y extraer aceite de dichas semilla o planta.

19. El método de la reivindicación 18, en el que dicho aceite se purifica o trata adicionalmente.

15 20. Un producto alimenticio que comprende una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, una planta de acuerdo con la reivindicación 15 o una composición de acuerdo con la reivindicación 16.

20 21. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, una planta de acuerdo con la reivindicación 15 o una composición de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en terapia.

25 22. Un método de preparación de un producto alimenticio, comprendiendo el método mezclar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, una planta de acuerdo con la reivindicación 15 o una composición de acuerdo con la reivindicación 16, con un vehículo adecuado.

23. Un método de preparación de un producto alimenticio, en donde el método comprende obtener un extracto de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el extracto comprende DPA, y mezclar el extracto con un vehículo adecuado.

30 24. Un método de preparación de un producto alimenticio, comprendiendo el método obtener un extracto de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el extracto comprende DPA, purificar DPA del extracto y mezclar DPA con un vehículo adecuado.

35 25. Un método de producir una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método introducir en una célula vegetal uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:

- una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional,

40 en el que el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, en donde la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte EPA en DPA.

45 26. Un método de producir una semilla transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, comprendiendo el método

i) introducir en una célula progenitora de una semilla uno o más polinucleótidos que codifican enzimas de la siguiente combinación:

50 - una $\Delta 5$ desaturasa, una $\Delta 6$ desaturasa y una $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional, en donde el uno o más polinucleótidos están unidos de manera operativa a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, produciendo de este modo una célula progenitora recombinante, en donde la $\Delta 5/\Delta 6$ elongasa bifuncional convierte EPA en DPA,

55 ii) cultivar dicha célula progenitora recombinante para producir una planta que comprende dicha semilla transgénica, y
iii) recuperar la semilla de la planta así producida.

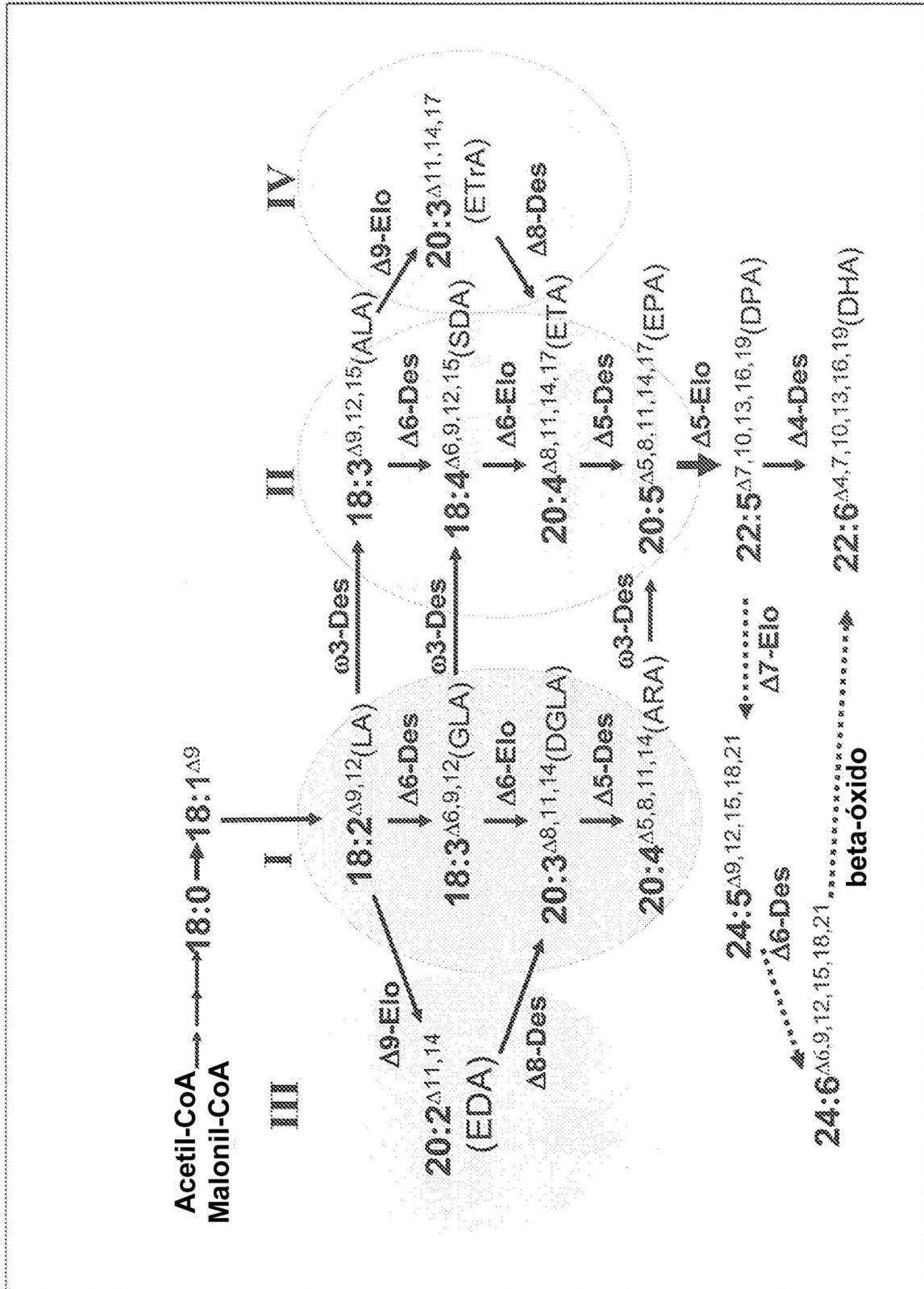


Figura 1

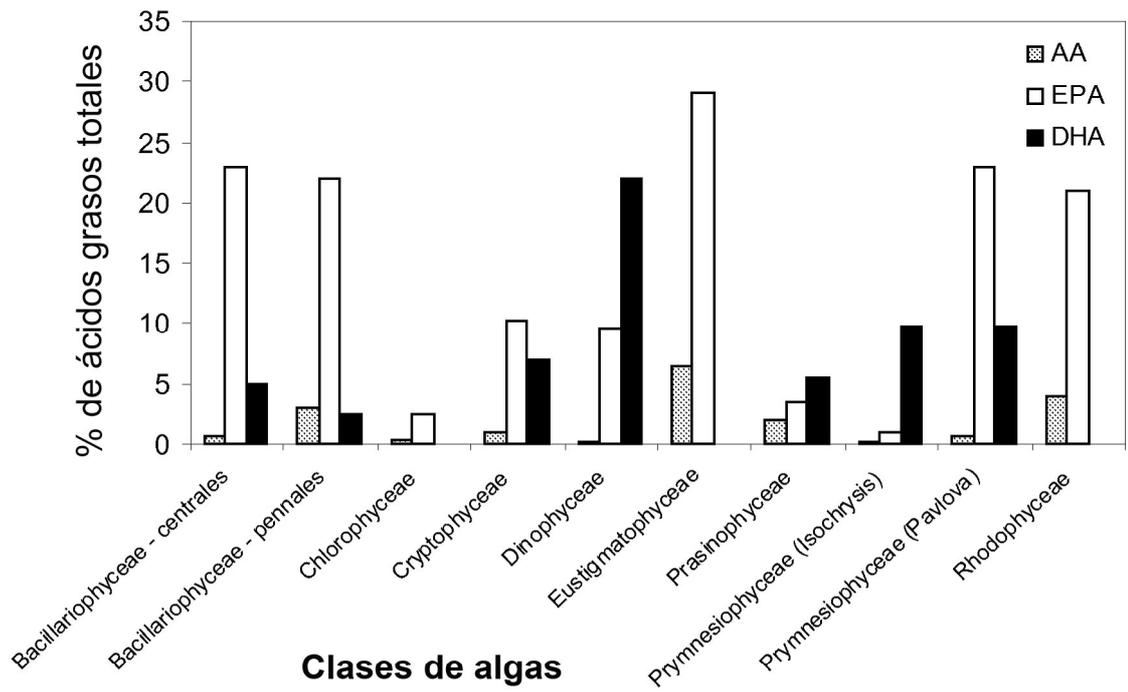


Figura 2

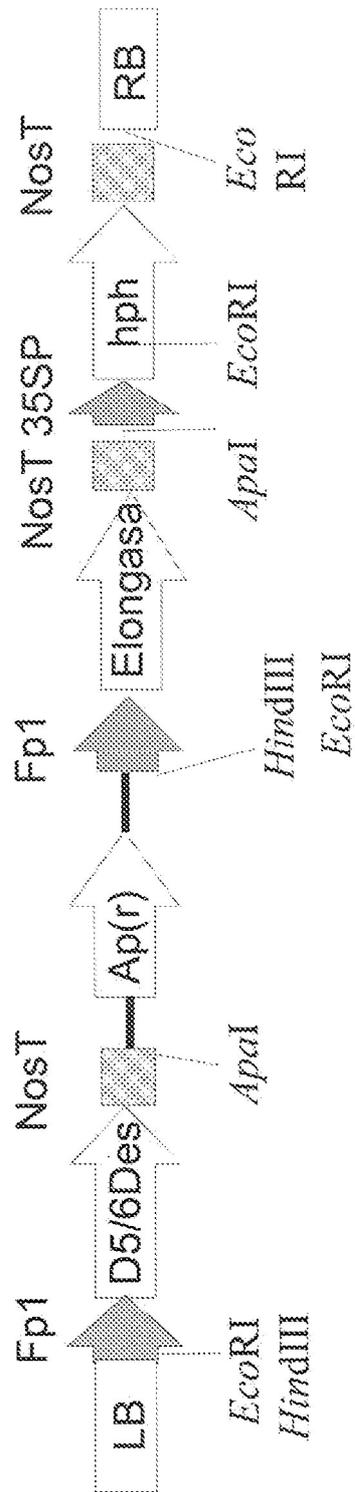


Figura 3

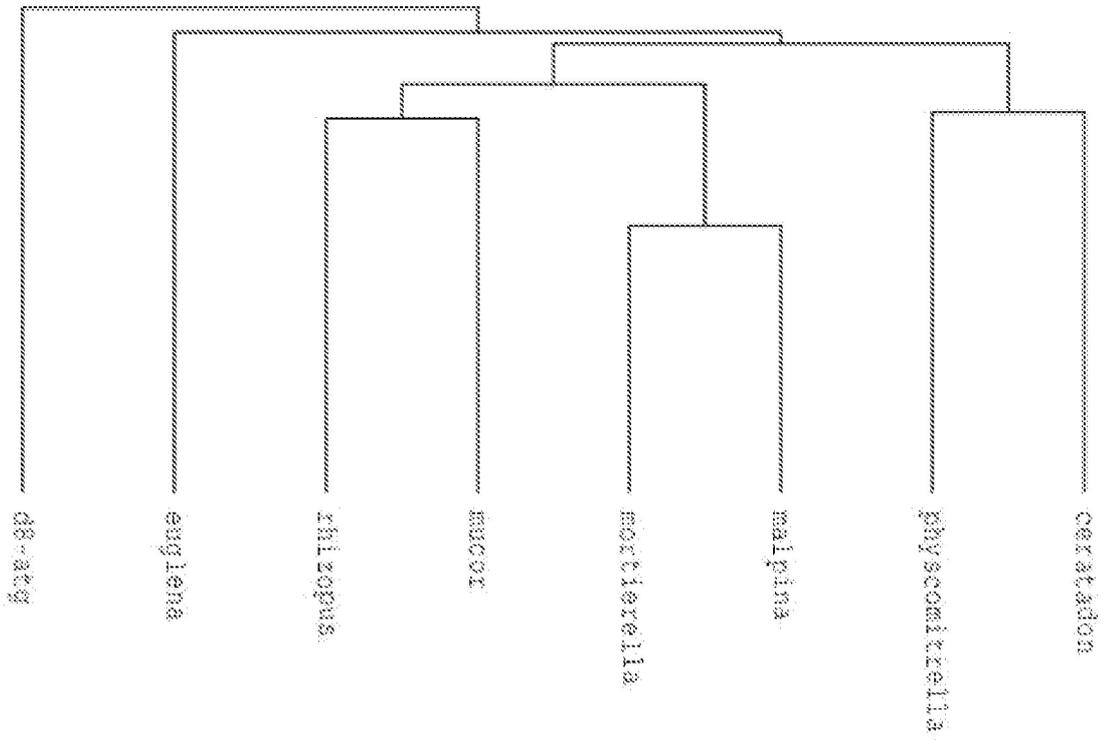


Figura 4

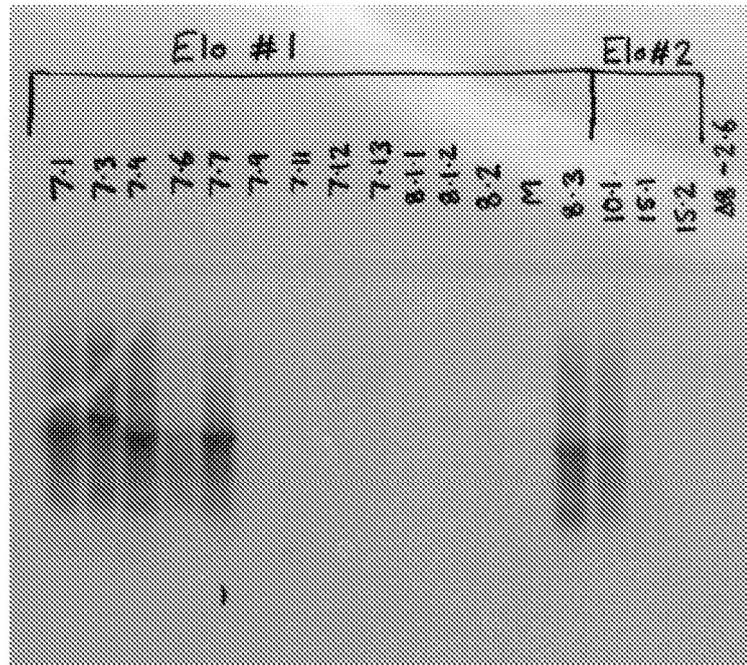


Figura 5

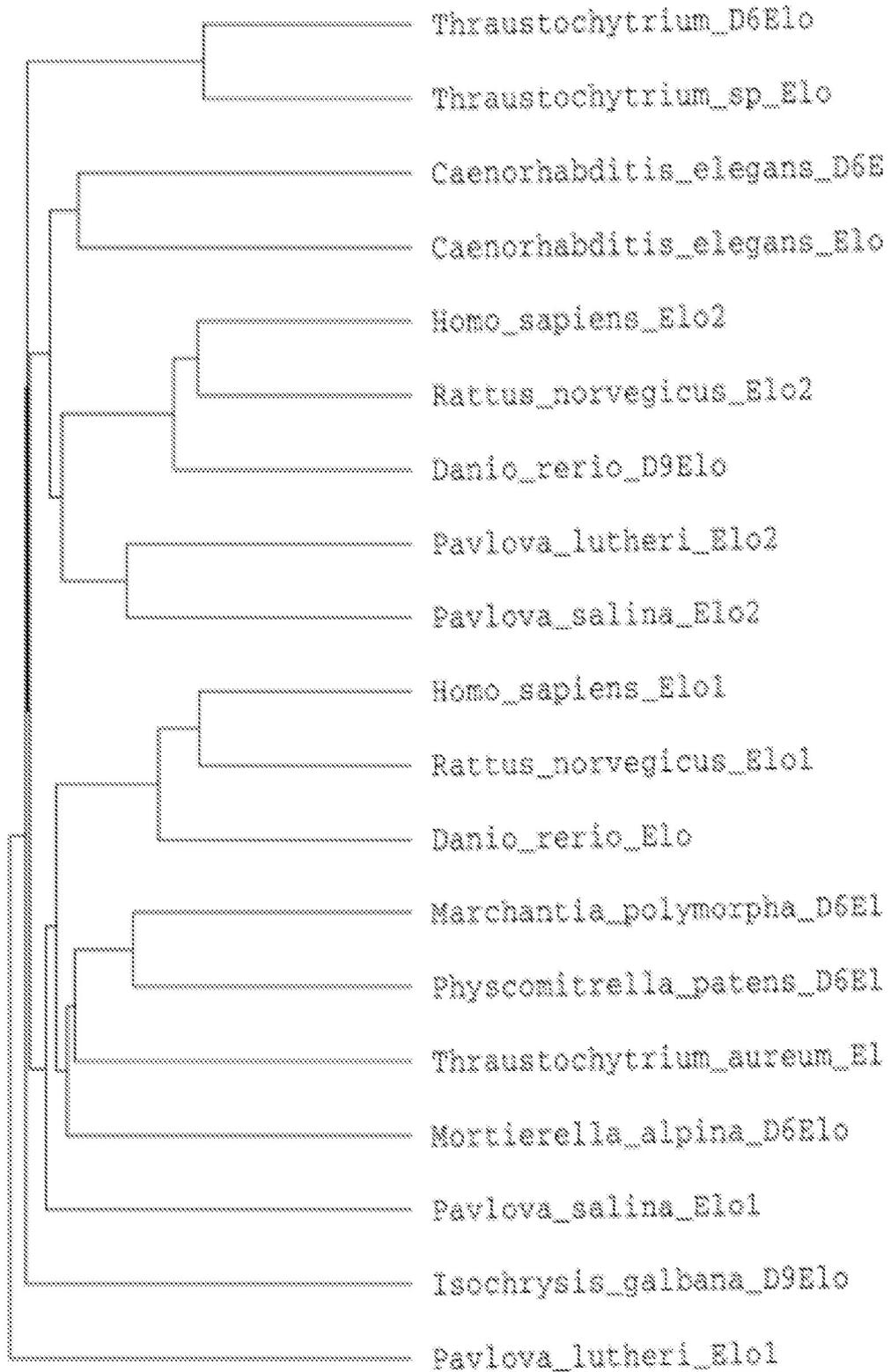


Figura 6

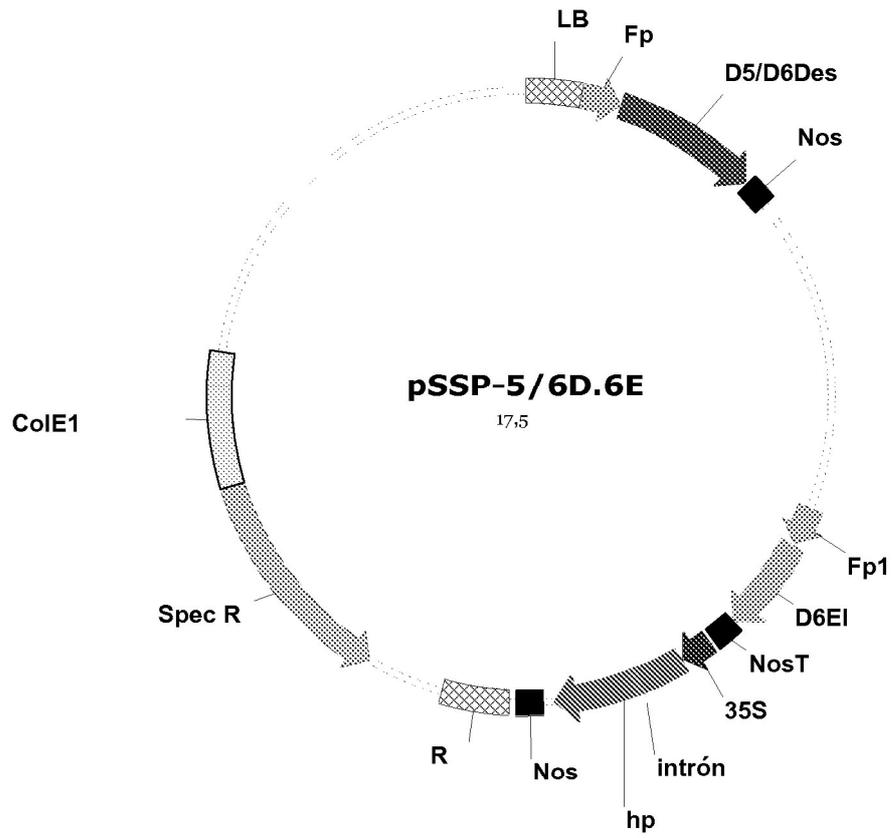


Figura 7A

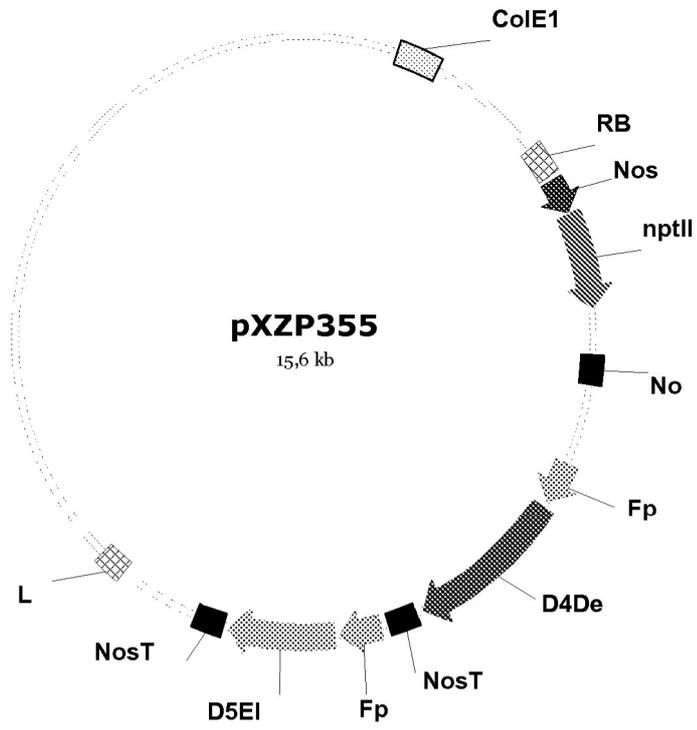


Figura 7B

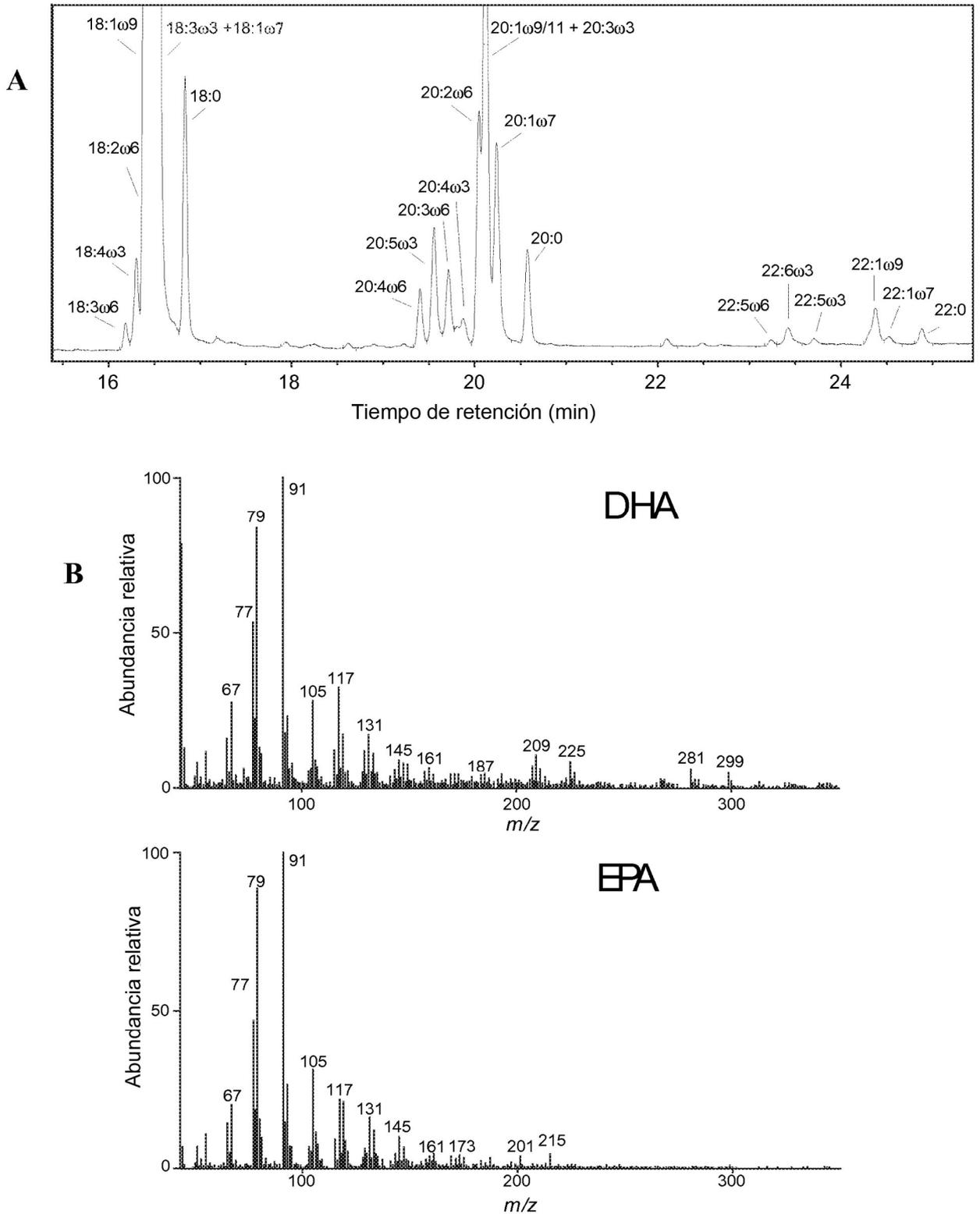


Figura 8

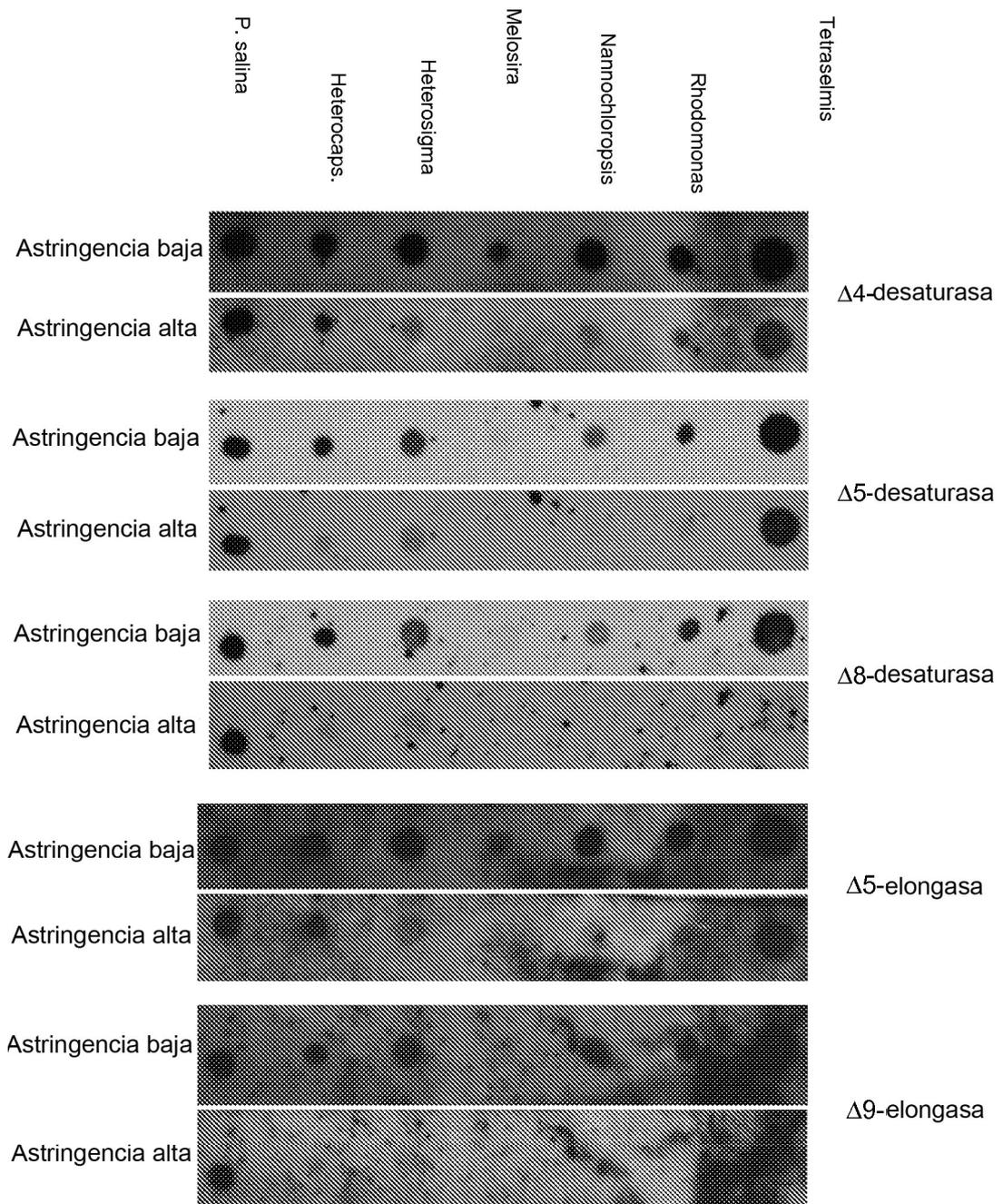


Figura 9

ES 2 715 640 T3

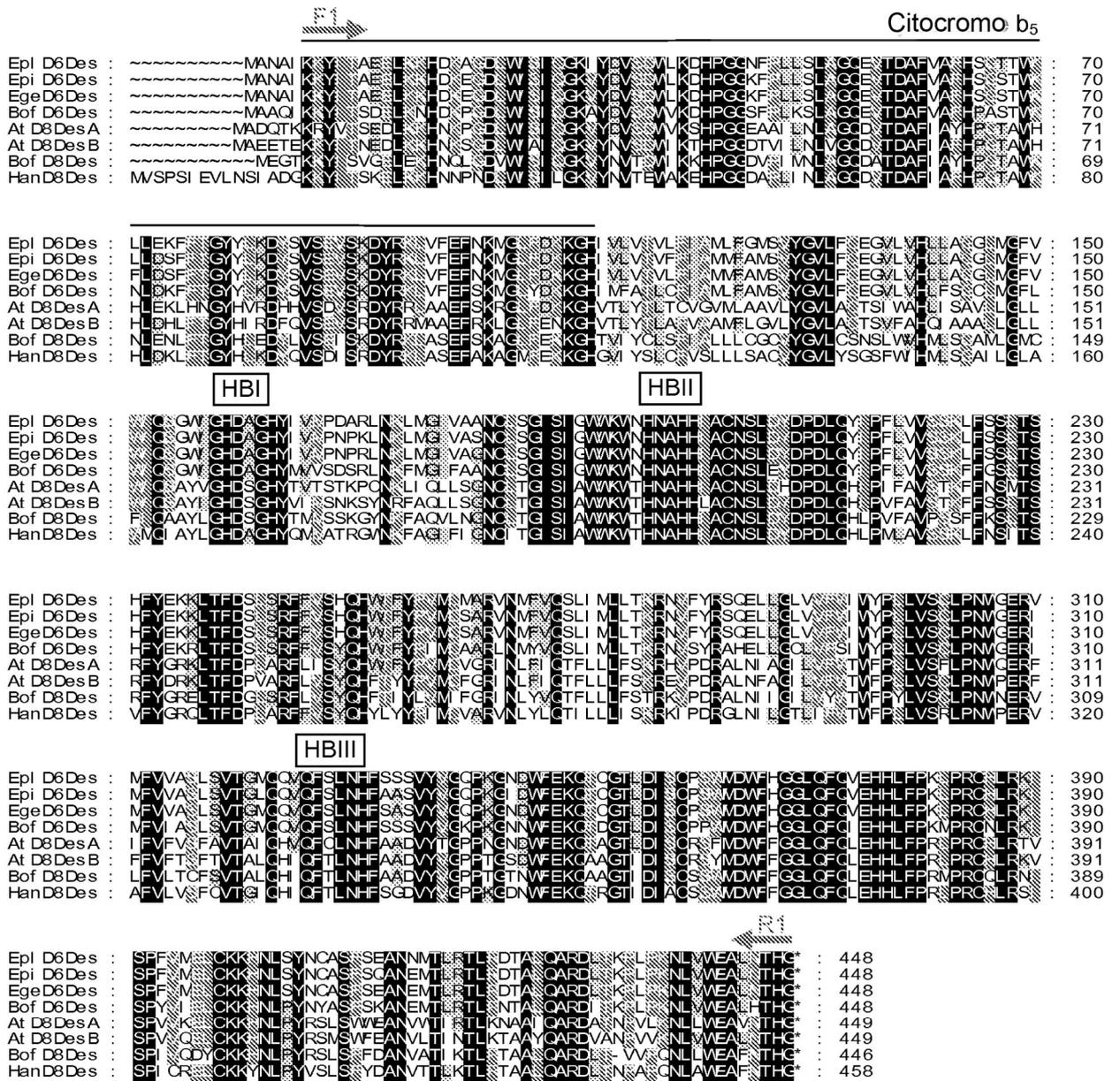
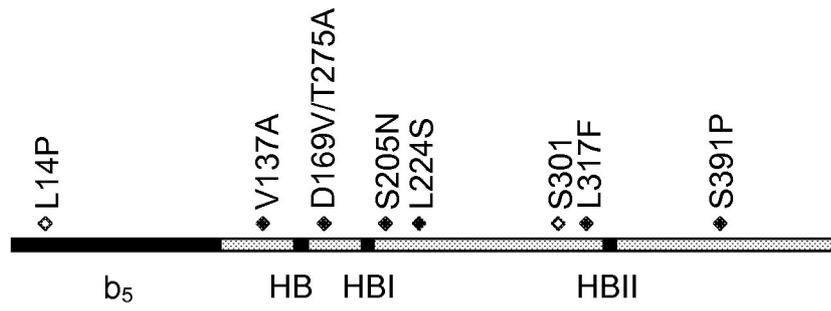


Figura 10

A



B

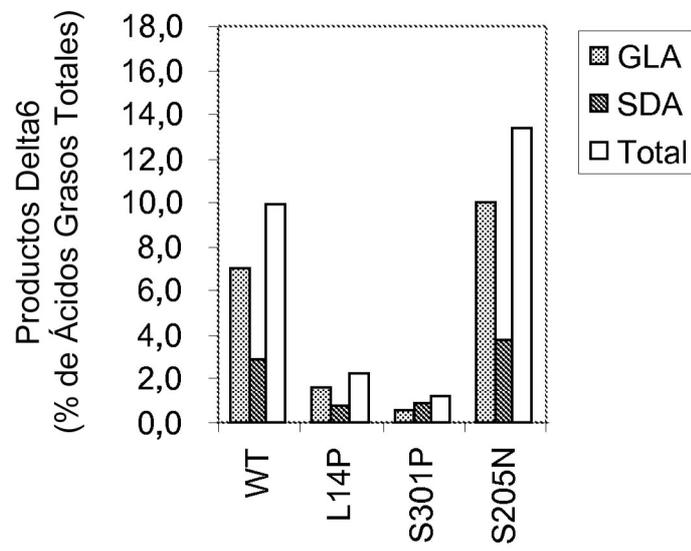


Figura 11

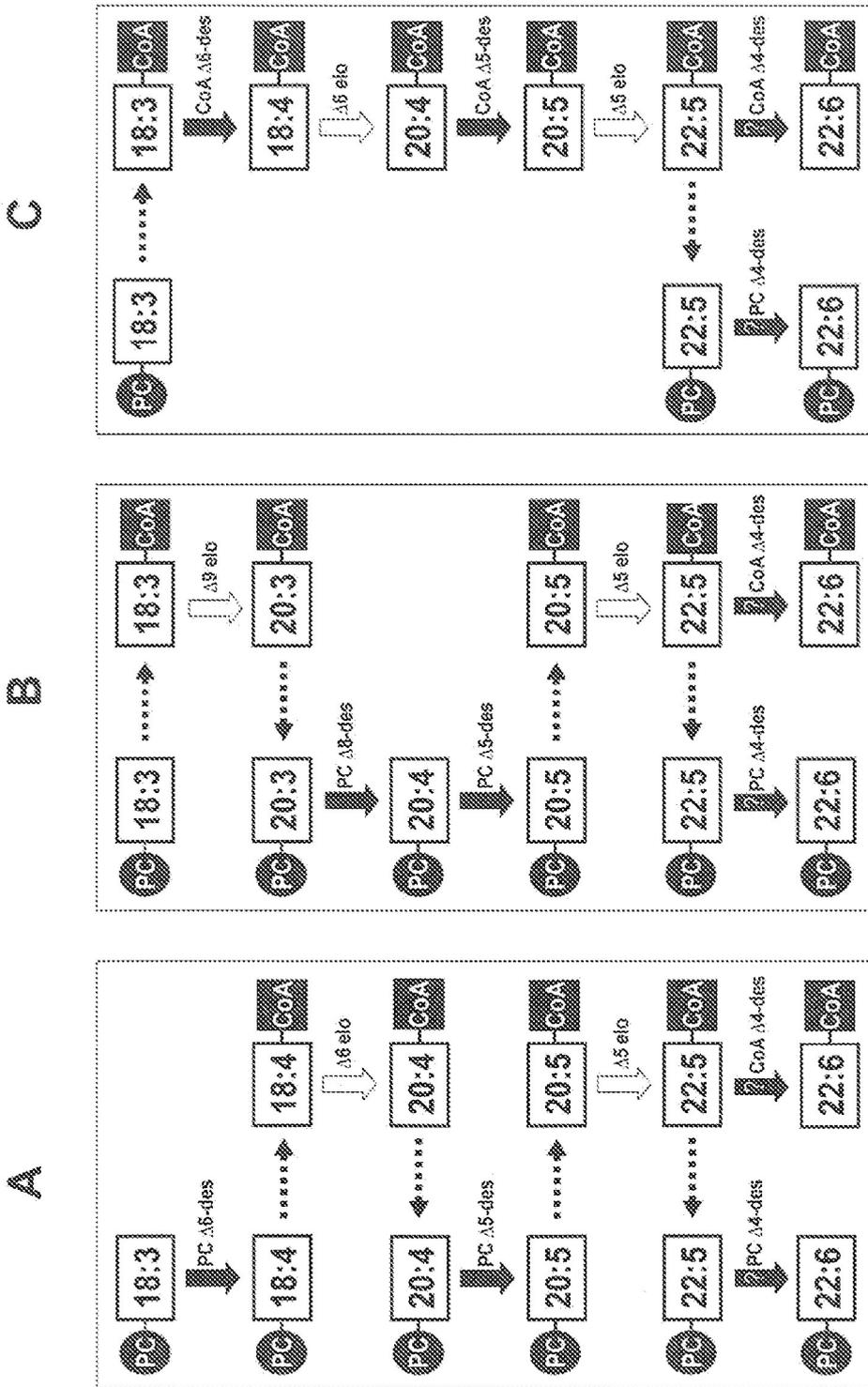


Figura 12

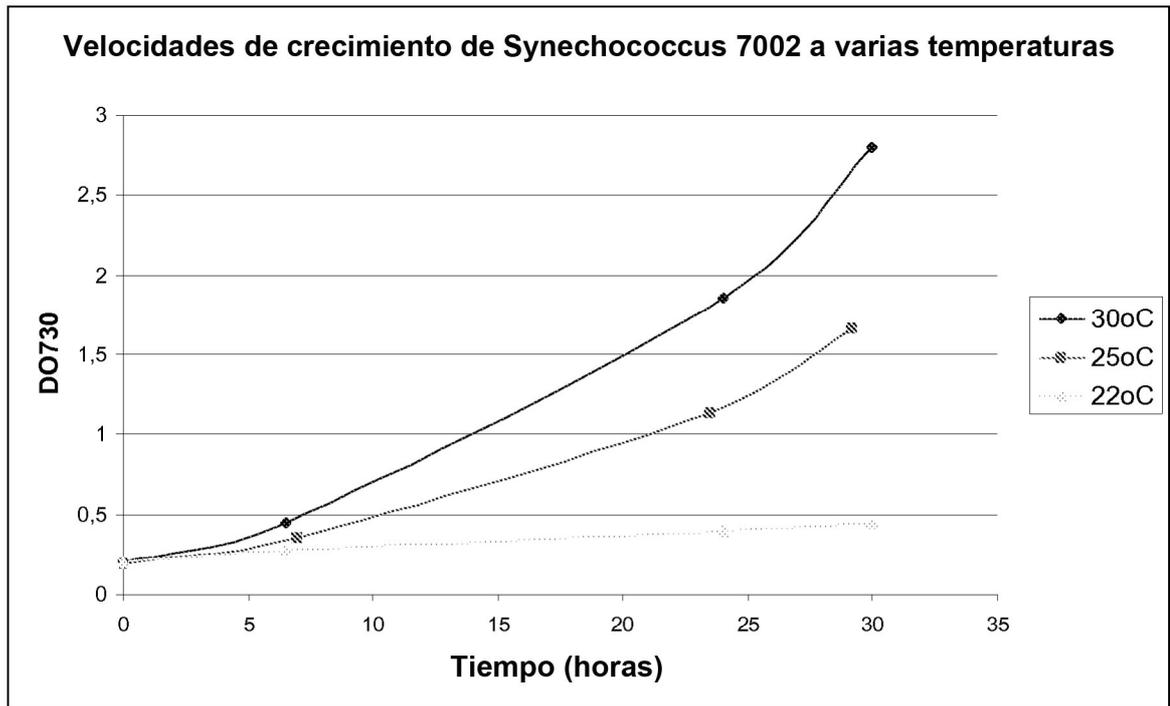


Figura 13

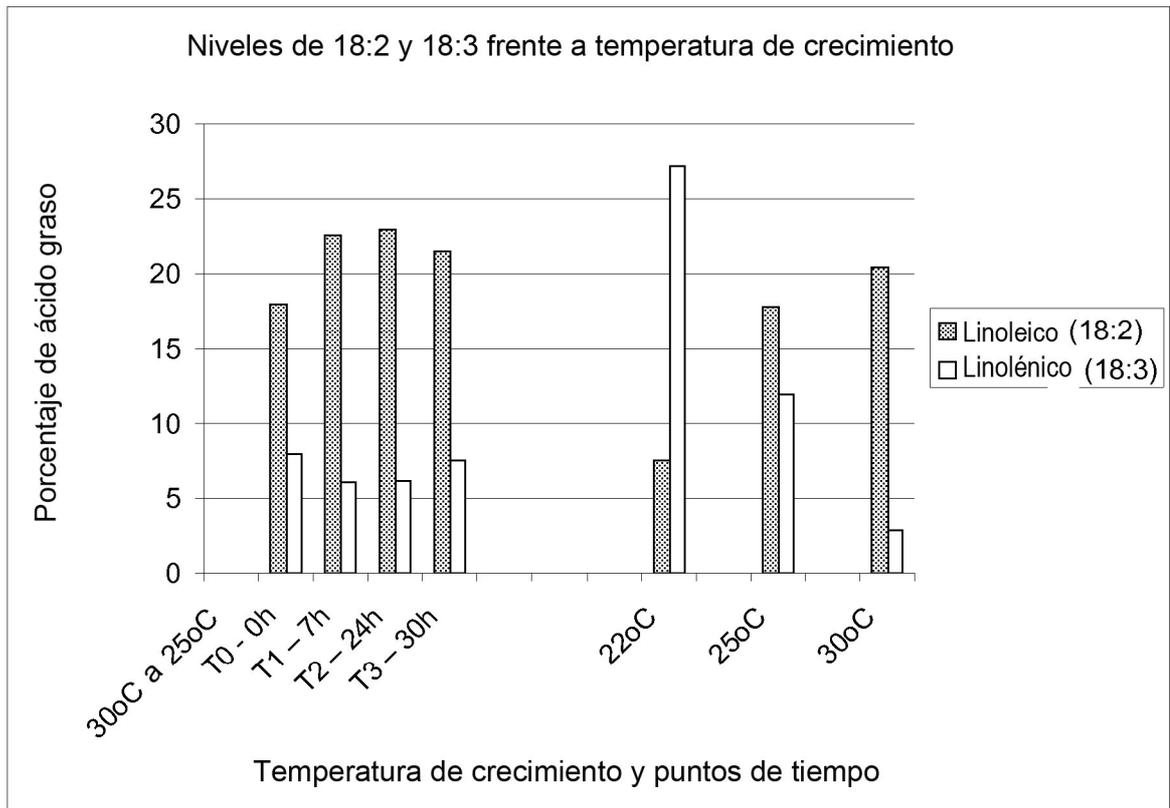


Figura 14