



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 433**

51 Int. Cl.:
C12N 15/52 (2006.01)
C07K 14/44 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 1/10 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00960626 .0**
86 Fecha de presentación : **08.09.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1214418**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.2002**

54 Título: **Ácido nucleico a partir de *Tetrahymena* que codifica para una delta-6 desaturasa, su producción y su uso.**

30 Prioridad: **10.09.1999 DE 199 43 270**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **Nutrinova Nutrition Specialties & Food
Ingredients GmbH
Industriepark Höchst
65926 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es: **Rüsing, Matthias;
Kiy, Thomas y
Dominitzki, Annette**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 299 433 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

Ácido nucleico a partir de *Tetrahymena* que codifica para una delta-6 desaturasa, su producción y su uso.

5 La presente invención se refiere a una delta-6 desaturasa de *Tetrahymena*, a su ácido nucleico codificante así como a su producción y a su uso.

La invención se refiere a un ácido nucleico a partir de *Tetrahymena* que codifica para una delta-6 desaturasa específica para ciliado, que participa en eucariotas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (denominados PUFA en inglés: polyunsaturated fatty acids) de valor comercial. A este respecto los ácidos nucleicos según la invención y los polipéptidos que pueden obtenerse a partir de ellos muestran una identidad de secuencia sorprendentemente reducida con respecto a otras desaturasas naturales conocidas. La invención se refiere además al uso de los ácidos nucleicos para la sobreexpresión en eucariotas especialmente ciliados, preferiblemente *Tetrahymena*, especialmente preferible *Tetrahymena thermophila*, con el objetivo de la modificación dirigida del espectro de ácidos grasos, especialmente del aumento de la formación de PUFA.

Los ácidos nucleicos según la invención pueden obtenerse a partir de ciliados, preferiblemente a partir de *Tetrahymena*, especialmente preferible a partir de *Tetrahymena thermophila*, un organismo productor de GLA con muy alto contenido en GLA.

En la figura 1 se representa un esquema general de la biosíntesis de PUFA y las enzimas participantes en eucariotas (modificado según Gill & Valivety, Trends Biotechnol. 1997, 15:401-409). La conversión de ácido esteárico (18:0) en ácido oleico (18:1 Δ 9) se cataliza mediante una delta-9 desaturasa. El ácido oleico se convierte en ácido linoleico (18:2 Δ 9,12; abreviatura: LA) mediante una delta-12 desaturasa, que se convierte a su vez en ácido γ -linolénico (18:3, Δ 6,9,12; abreviatura: GLA) mediante una delta-6 desaturasa o en ácido α -linolénico (18:3, Δ 9,12,15; abreviatura: ALA) mediante una delta-15 desaturasa). El alargamiento de los ácidos nucleicos se cataliza mediante elongasas, mediante lo cual se forma por ejemplo a partir del ácido γ -linolénico ácido dihomo- γ -linolénico (20:3 Δ 8,11,15; abreviatura: DGLA), que a su vez se convierte en ácido araquidónico (20:4 Δ 5,8,11,15; abreviatura: ARA) mediante una delta-5 desaturasa, un precursor directo de eicosanoides fisiológicamente eficaces, tales como por ejemplo prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos. En el caso de la formación de PUFA, que se derivan de GLA (a continuación denominados ácidos grasos delta-6 insaturados) se ha mostrado la conversión de LA en GLA mediante la delta-6 desaturasa como etapa limitante (Huang YS & Mills DE (1996) γ -linolenic acid. Metabolism and its role in nutrition and medicine. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

Se conoce la existencia de una enzima con actividad delta-6 desaturasa en *Tetrahymena setosa* y *T. pyriformis* (Peng, Y. M. y Elson, C.E. (1971) J. Nutr. 101, 1177-1184), pero hasta ahora no se ha proporcionado una proteína homogénea con una actividad de este tipo a partir de un ciliado (por ejemplo Koll, M. y Erwin, J.A. (1990) J. Protozool. 37 (3), 229-237).

Puesto que los vertebrados no pueden insertar dobles enlaces detrás de la posición 9 en ácidos grasos, los ácidos grasos insaturados tales como LA y ALA son nutrientes esenciales que los vertebrados no pueden sintetizar (véase la figura 1) y en la alimentación proceden principalmente de fuentes vegetales. Los mamíferos pueden convertir LA en GLA (un precursor de ARA) mediante una delta-6 desaturasa, que es un precursor esencial de la mayoría de las prostaglandinas. La formación de ácido estearidónico (18:4 Δ 6,9,12,15) (un precursor de EPA) a partir de ALA se cataliza igualmente por medio de delta-6 desaturasa. Con ello la delta-6 desaturasa es la primera etapa esencial en la biosíntesis de los eicosanoides (véase la figura 1).

Se ha mostrado que la actividad de la delta-6 desaturasa puede verse afectada en el caso de mamíferos por factores tales como por ejemplo el consumo de alcohol, estrés, malnutrición y procesos de envejecimiento (Huang & Mills, 1996; Horrobin (1990) Rev. Contemp. Pharmacother. 1:1-45; Bolton-Smith C *et al.* (1997) Eur. J. Clin. Nutr. 51:619-624; Leventhal LJ *et al.* (1993) Ann. Intern. Med. 119:867-873). Esto conduce a una escasez de GLA y con ello finalmente a una deficiencia de las moléculas derivadas de GLA tales como ARA y los eicosanoides fisiológicamente importantes formados a partir de ellas, puesto que tal como ya se menciona en la formación de GLA a partir de LA mediante la delta-6 desaturasa se trata de una etapa limitante de la síntesis de PUFA (Brenner RR (1976) Adv. Exp. Med. Biol. 83:85-101; Nakahara T *et al.* (1993) J. Jpn. Oil Chem. Soc. 42:242-253; Chapkin, RS (1998) Reappraisal of the essential fatty acids. En: Fatty acids in food and their health implications, 2ª Ed. (Chow CK, ed) Marcel Dekker, Nueva York, NY). El suministro de GLA puede tanto compensar un nivel endógeno reducido de ácidos grasos delta-6 insaturados, como cubrir un aumento de la necesidad de estos ácidos grasos (Horrobin (1990)). Para la biosíntesis de moléculas derivadas de GLA es ventajoso por tanto la absorción de GLA mediante el alimento (Fan, YY & Chapkin, RS (1998) J. Nutr. 128:1411-1414).

El hallazgo de que GLA ejerce múltiples influencias positivas sobre el cuerpo humano se ha corroborado desde entonces mediante un gran número de estudios científicos. Así se ha demostrado mediante estudios clínicos la acción positiva del GLA por ejemplo sobre eccema atópico (Shimasaki, H: PUFA content and effect of dietary intake of γ -linolenic acid-rich oil on profiles of n-6, n-3 metabolites in plasma of children with atopic eczema. J. Clin. Biochem. Nutr. (1995), 19(3), 183-192.), artritis reumatoide (Zurier RB, Rossetti RG, Jacobson EW, DeMarco DM, Liu NY, Temming JE, White BM, Laposata M (1996) γ -linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis: A randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 39 (11) 1808-1817), aterosclerosis (Leng GC, Lee AJ, Fowkes FGR, Jepson

RG, Lowe GDO, Skinner ER, Mowat BF, Randomized controlled trial of γ -linolenic acid and eicosapentaenoic acid in peripheral arterial disease, *Clinical Nutrition*, (1998) 17/6 265-271.), neuropatía diabética (Pfeifer MA, Schumer MP (1995) Clinical trials of diabetic neuropathy: past, present, and future. *Diabetis* 44(12) 1355-61), migraña (Wagner W, Nootbaar-Wagner U (1997) Prophylactic treatment of migraine with γ -linolenic and alpha-linolenic acids, *Cephalalgia* 17/2 127-130), esquizofrenia (Vaddadi, KS (1982) Some observations on the use of prostaglandin E1 precursor in the treatment of schizofrenia. *Biol. Aspects Schizophr. Addict.* 183-91. Editorial: Wiley, Chichester, RU) y cáncer (Kairremo KJA, Jekunen AP, Korppi-Tommola ET, Pyrhonen SO (1997) Effects of lithium γ -linolenate on the perfusion of liver and pancreatic tissues in pancreatic cancer. *Anticancer Research* 17/5 B 3729-3736.). En estos estudios se ha obtenido tanto una mejora estadística como clínicamente significativa del cuadro clínico. A este respecto la acción de GLA se basa sobre todo en la formación de eicosinoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos), para los que GLA representa una molécula precursora en la biosíntesis (figura 1).

Debido a estas propiedades positivas existe un amplio espectro de aplicación para GLA en la industria farmacéutica, cosmética, de piensos y alimentaria (Horrobin (1990), Horrobin (1992) *Prog. Lipid Res.* 31:163-194; Chapkin (1998), Fan & Chapkin (1998).

La mayor parte de los PUFA de los seres humanos o animales proceden o bien directamente a partir de la alimentación o bien se producen mediante la transformación de los ácidos grasos esenciales suministrados mediante la alimentación, mediante desaturasas y elongasas. Por tanto son de gran interés comercial los genes de la biosíntesis de PUFA de organismos en los que se producen de manera natural estos PUFA. Mediante la expresión funcional dirigida de estos genes en los organismos o células, pueden conseguirse una producción comercial de PUFA en estos sistemas. Por este motivo existe una necesidad de genes para desaturasas y elongasas de la biosíntesis de PUFA, así como para la obtención comercial de PUFA y aceites de PUFA mediante métodos económicos fiables con ayuda de estos genes.

Ninguna de las semillas oleaginosas utilizadas comercialmente produce GLA. En cambio, GLA aparece sólo en el aceite de las semillas de diferentes plantas tales como la onagra (*Oenothera biennis*, aproximadamente el 10% de GLA), la borraja (*Borago officinalis*, aproximadamente el 23%) y la grosella negra (*Ribes nigrum*, aproximadamente el 18%). Además se conocen también diferentes microorganismos como fuentes para GLA, tales como por ejemplo los hongos *Mucor* y *Mortierella* (hasta aproximadamente el 25%), el alga azul *Spirulina* (aproximadamente el 12-18%) y otros. Como fuentes especiales ricas en GLA se describieron ciliados tales como por ejemplo *Tetrahymena* (hasta el 47%; Hill, DL (1972) *The biochemistry and physiology of Tetrahymena*. Capítulo 3, 46-73. Academic press, Nueva York, Londres; Erwin, J & Bloch, K (1963) *J. Biol. Chem.* 238:1618-1624). Una buena visión sobre las fuentes naturales de GLA la ofrecen Phillips & Huang (Phillips JC, Huang YS (1996) Natural sources and biosynthesis of γ -linolenic acid: an overview. 1-13 En: γ -linolenic acid. Metabolism and its role in Nutrition and medicine. Huang YS, Mills DE (Ed.) AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

La obtención comercial de GLA a partir de estas fuentes naturales está asociada sin embargo con algunos inconvenientes. Tanto la calidad como la cantidad de los aceites obtenidos a partir de estos organismos varían, y los aceites presentan parcialmente una composición muy heterogénea, lo que hace que se necesiten etapas de purificación costosas y caras para enriquecer en GLA. El cultivo de plantas que contienen GLA tampoco es muy rentable (Hansen CE *et al.* (1991) *J. Sci. Food Agric.* 54:309-312). Para la obtención de aceite que contiene GLA se ha mostrado que el rendimiento de espacio/tiempo en el caso de algunos microorganismos que producen GLA es claramente mejor en comparación con plantas superiores. Por este motivo, la producción fermentativa de GLA mediante microorganismos ofrece una alternativa prometedora con respecto a otras fuentes de GLA. El espectro de ácidos grasos de muchos microorganismos es con frecuencia muy simple en comparación con organismos superiores, lo que ofrece grandes ventajas en el caso de la purificación. Además, la producción fermentativa no depende de factores externos tales como el tiempo, oferta de alimentos etc. Además, los PUFA producidos de este modo están en gran medida libres de contaminaciones que se deben por ejemplo a la contaminación ambiental. Otra ventaja es que el GLA obtenido mediante procesos fermentativos al contrario de GLA a partir de fuentes naturales no está sometido a ninguna variación en la disponibilidad.

Ya había ensayos para establecer la obtención fermentativa de GLA (Ratledge C (1993) *Trends Biochem.* 11:278-284; Ratledge C (1989) *Biochem. Soc. Trans.* 17:1139-1141; Gosselin Y *et al.* (1989) *Biotechnol. Lett.* 11:423-426; documento W086/03518). Sin embargo para una producción de GLA fermentativa, comercial mediante microorganismos es deseable un aumento del contenido en GLA, puesto que la fermentación de microorganismos productores de PUFA se considera como relativamente costosa y cara y con ello como no muy rentable (Ratledge 1993, citado anteriormente). Debido a su contenido en GLA relativamente alto (citado anteriormente) es especialmente adecuada *Tetrahymena thermophila* para una obtención fermentativa de GLA. *Tetrahymena* puede cultivarse bien en el fermentador y pueden conseguirse altas densidades celulares (Kiy, T. & Tiedtke (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 576-579; Kiy, T. & Tiedtke, A. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 141-146).

Por tanto, es objetivo de la presente invención proporcionar ácidos nucleicos a partir de *Tetrahymena*, que codifican para un polipéptido con la actividad de una delta-6 desaturasa y su expresión y sobreexpresión funcional en un huésped, preferiblemente en *Tetrahymena*, con el objeto de enriquecer en GLA y/o ácidos grasos delta-6 insaturados.

Por tanto, es objeto de la presente invención un ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1 que codifica para una delta-6 desaturasa con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 y partes del mismo con al menos 8 nucleótidos, preferiblemente con al menos 15 ó 20 nucleótidos, especialmente con al menos 100 nucleótidos, sobre todo con al menos 300 nucleótidos (a continuación denominados "ácido(s) nucleico(s) según la invención"). Igualmente otro

ES 2 299 433 T3

objeto de la invención es un ácido nucleico según la SEQ ID NO: 3, que contiene la secuencia genómica y que comprende además de la secuencia codificante para una delta-6 desaturasa también secuencias de ácido nucleico no codificantes tales como intrones, promotores y secuencias flanqueantes.

5 El ácido nucleico completo según la SEQ ID NO: 1 codifica para una proteína con 352 aminoácidos y una masa molecular teórica de 41,8 kDa. Los análisis secuenciales según la presente invención confirman que en el caso del ácido nucleico se trata de un ácido nucleico que codifica para una delta-6 desaturasa de *Tetrahymena*.

10 Mediante una comparación de homología pudo identificarse la secuencia proteica según la SEQ ID NO: 2 derivada de la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) como una delta-6 desaturasa. Para la comparación de homología se utilizó la función BLASTP (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402). Como proteínas homólogas se identificaron desaturasas, especialmente delta-6 desaturasas (E.C. 1.14.99.25; linoleoil-CoA desaturasa) a partir de los bancos de datos (véase la figura 2). A este respecto, las delta-6 desaturasas conocidas presentan como máximo una identidad del 25% con respecto a la secuencia polipeptídica según la invención (véanse las figuras 3A-3E). En la
15 figura 4 se muestra una alineación múltiple de diferentes delta-6 desaturasas conocidas con la secuencia polipeptídica según la invención. Las homologías se encuentran especialmente en los dominios conservados, tales como las cajas de histidina (Los & Murata, 1998. *Biochem. Biophys. Acta* 1394:3-15; Shanklin, J *et al.* 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6743-6747). Además pudo identificarse, como en el caso de otras delta-6 desaturasas eucariotas, un dominio de citocromo b5 (Lederer, F. (1994) *Biochimie* 76, 674-692; Cho *et al.* *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (1):471-477). Aunque la secuencia polipeptídica según la invención puede identificarse como delta-6 desaturasa, se distinguen esencialmente de otras delta-6 desaturasas. Es llamativo sobre todo que la secuencia con 352 aminoácidos sea aproximadamente un 20% más corta que otras delta-6 desaturasas eucariotas. Además, la secuencia presenta, en regiones muy conservadas, un gran número de divergencias únicas. Así, el motivo de HHLFP conservado al 100% en el caso de otras delta-6 desaturasas está modificado en HHFFP (véase la figura 4). La identidad de la secuencia polipeptídica según la
20 invención con respecto a las desaturasas conocidas es sorprendentemente baja por estos motivos.

Mediante la sobreexpresión dirigida de la desaturasa por ejemplo en *Tetrahymena* puede modificarse de manera significativa el espectro de ácidos grasos (véanse las tablas 1 y 2). A este respecto se llega a un desplazamiento de la razón de los ácidos grasos saturados con respecto a los insaturados hasta claramente más ácidos grasos insaturados. A
30 este respecto es de especial interés el aumento de la productividad de GLA que puede conseguirse de ese modo.

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico según la invención es un ADN o ARN, preferiblemente un ADN bicatenario y especialmente un ADN con una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1 desde la posición 33 hasta la posición 1091. Las dos posiciones determinan según la presente invención el inicio y el final de la región codificante.
35

Las partes o fragmentos de los ácidos nucleicos según la invención pueden usarse por ejemplo para la producción de epítomos individuales, como sondas para la identificación de variantes funcionales o como ácidos nucleicos antisentido. Es adecuado por ejemplo un ácido nucleico de al menos aproximadamente 8 nucleótidos como ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico de al menos aproximadamente 15 nucleótidos como cebador en el procedimiento de PCR, un ácido nucleico de al menos aproximadamente 20 nucleótidos para la identificación de otras variantes y un ácido nucleico de al menos aproximadamente 100 nucleótidos como sonda.
40

En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico según la invención contiene una o varias secuencias no codificantes (UTR entre otras). Las secuencias no codificantes son por ejemplo secuencias de intrón o secuencias reguladoras, tales como secuencias de promotor o de potenciador, para la expresión controlada del gen que codifica para delta-6 desaturasa. Por tanto, un objeto de la invención es un ácido nucleico según la invención según la SEQ ID NO: 3, que puede aislarse a partir de *Tetrahymena thermophila* y representa la secuencia genómica de la delta-6 desaturasa con intrones, promotores y UTR.
45

Por tanto, en otra forma de realización, el ácido nucleico según la invención está contenido en un vector, preferiblemente en un vector de expresión.
50

Los vectores de expresión pueden ser por ejemplo vectores de expresión procariotas o eucariotas. Ejemplos de vectores de expresión procariotas son para la expresión en *E. coli* por ejemplo el vector de expresión T7 pGM10 (Martin, 1996), que codifica para una etiqueta de Met-Ala-His6 N-terminal, que permite una purificación ventajosa de la proteína expresada a través de una columna de Ni²⁺-NTA. Como vectores de expresión eucariotas para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* son adecuados por ejemplo los vectores p426Met25 o p426GAL1 (Mumberg *et al.* (1994) *Nucl. Acids Res.*, 22, 5767), para la expresión en células de insecto, por ejemplo, los vectores de baculovirus tales como se dan a conocer en el documento EP-B1-0127839 o el documento EP-B1-0549721, y para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, vectores del SV40, que en general pueden obtenerse.
55

En general, los vectores de expresión contienen también para las células huésped secuencias reguladoras adecuadas, tales como por ejemplo el promotor de *trp* para la expresión en *E. coli* (véase por ejemplo el documento EP-B1-0154133), el promotor de ADH-2 para la expresión en levaduras (Russel *et al.* (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674), el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión en células de insecto (véase por ejemplo el documento EP-B1-0127839) o el anterior promotor del SV40 o promotores de LTR por ejemplo del VTMR (virus del tumor mamario del ratón; Lee *et al.* (1981) *Nature*, 214, 228).
65

ES 2 299 433 T3

Para la transformación de y la expresión en *Tetrahymena* son adecuados por ejemplo los vectores descritos por Gaertig *et al.* ((1999) Nature Biotech. 17:462-465) o Gaertig & Kapler ((1999) Methods in Cell Biol. 62:485-500).

5 Los ácidos nucleicos según la invención pueden sintetizarse por ejemplo químicamente mediante las secuencias dadas a conocer en la SEQ ID NO: 1 y 3 o mediante la secuencia peptídica dada a conocer en la SEQ ID NO: 2 recorriendo al código genético, por ejemplo, según el método de fosfotriéster (véase por ejemplo Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, nº 4). Otra posibilidad para conseguir los ácidos nucleicos según la invención es el asilamiento a partir de un banco de genes adecuado, de un organismo que tiene actividad delta-6 desaturasa, mediante una sonda adecuada (véase por ejemplo Sambrook, J. *et al.* (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 10 2ª Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). Como sonda son adecuados por ejemplo fragmentos de ADN monocatenario con una longitud desde aproximadamente 100 hasta 1000 nucleótidos, preferiblemente con una longitud desde aproximadamente 200 hasta 500 nucleótidos, especialmente con una longitud desde aproximadamente 300 hasta 400 nucleótidos, cuya secuencia puede derivarse a partir de la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1 ó 3.

15 Por tanto, la invención se refiere igualmente a un procedimiento para la producción de un ácido nucleico según la invención, sintetizándose químicamente el ácido nucleico o aislándose mediante una sonda a partir de un banco de genes.

Otro objeto de la presente invención es también el propio polipéptido con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 y partes del mismo con al menos 12 aminoácidos, especialmente con al menos 65 aminoácidos y sobre todo con al menos 150 aminoácidos (a continuación denominado "polipéptido según la invención"). Un polipéptido de aproximadamente 12 aminoácidos de longitud puede contener por ejemplo un epítipo, que tras el acoplamiento a un soporte sirve para la producción de anticuerpos poli o monoclonales específicos (véase para esto por ejemplo el documento US 5.656.435). Los polipéptidos con un longitud de al menos aproximadamente 65 aminoácidos también 25 pueden servir directamente sin soporte para la producción de anticuerpos poli o monoclonales.

Además se prefieren los polipéptidos que presentan regiones conservadas de cajas de histidina y un dominio de citocromo b5. Se prefieren especialmente los polipéptidos según la invención que contienen un motivo de HHFFP.

30 Además, a esto pertenecen también las delecciones del polipéptido en el intervalo de aproximadamente 1-60, preferiblemente de aproximadamente 1-30, especialmente de aproximadamente 1-15, sobre todo de aproximadamente 1-5 aminoácidos. Por ejemplo, puede faltar el primer aminoácido metionina, sin que se modifique esencialmente la función del polipéptido. Además, a esto pertenecen también las proteínas de fusión que contienen los polipéptidos según la invención descritos anteriormente, pudiendo tener las propias proteínas de fusión ya la función de una delta-6 desaturasa o no pudiendo conseguir la función específica hasta la separación de la parte de fusión. Sobre todo, a esto pertenecen proteínas de fusión con una parte de secuencias especialmente de no ciliados de aproximadamente 1-200, preferiblemente de aproximadamente 1-150, especialmente de aproximadamente 1-100, sobre todo de aproximadamente 1-50 aminoácidos. Ejemplos de secuencias peptídicas de no ciliados son secuencias peptídicas procariontas, por ejemplo a partir de la galactosidasa de *E. coli* o una denominada etiqueta de histidina, por ejemplo una etiqueta 40 de Met-Ala-His6. Una proteína de fusión con una denominada etiqueta de histidina es adecuada de manera especialmente ventajosa para la purificación de la proteína expresada a través de columnas que contienen iones metálicos, por ejemplo a través de una columna de Ni²⁺-NTA. "NTA" significa el agente quelante "ácido nitrilotriacético" (Qiagen GmbH, Hilden).

45 Las partes del polipéptido según la invención representan por ejemplo epítopos que pueden reconocerse específicamente por anticuerpos.

El polipéptido según la invención puede producirse por ejemplo mediante la expresión del ácido nucleico según la invención en un sistema de expresión adecuado, tal como ya se describió anteriormente, según métodos conocidos en general por el experto. Como células huésped son adecuadas por ejemplo las cepas DH5, HB101 o BL21 de *E. coli*, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la línea de células de insecto lepidóptera, por ejemplo de *Spodoptera frugiperda*, o células animales tales como COS, Vero, 293 y HeLa, que en general pueden obtenerse todas.

55 Especialmente las partes mencionadas del polipéptido también pueden sintetizarse con ayuda de la síntesis de péptidos clásica (técnica de Merrifield). Son especialmente adecuadas para la obtención de antisueros, que con su ayuda pueden buscarse bancos de expresión génica adecuados, para acceder de ese modo a las variantes funcionales del polipéptido según la invención.

60 Por tanto, otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido según la invención, expresándose y dado el caso aislándose un ácido nucleico según la invención en una célula huésped adecuada.

Otro objeto de la presente invención se refiere también a anticuerpos que reaccionan de manera específica con el polipéptido según la invención, siendo las partes mencionadas anteriormente del polipéptido o bien inmunógenas por sí mismas o bien pueden convertirse en inmunógenas mediante el acoplamiento a un soporte adecuado, tal como por ejemplo albúmina sérica bovina, o puede aumentarse su inmunogenicidad.

Los anticuerpos son o bien policlonales o bien monoclonales. La producción, que igualmente representa un objeto de la presente invención, tiene lugar por ejemplo según métodos conocidos en general mediante la inmunización de un animal mamífero, por ejemplo un conejo, con el polipéptido según la invención o las partes mencionadas del mismo, dado el caso en presencia de, por ejemplo, adyuvante de Freund y/o geles de hidróxido de aluminio (véase por ejemplo Diamond, B.A. *et al.* (1981) *The New England Journal of Medicine*, 1344). A continuación, los anticuerpos policlonales que se producen en animales debido a una reacción inmunológica pueden aislarse fácilmente de la sangre según métodos conocidos en general y purificarse por ejemplo a través de cromatografía en columna. Se prefiere una purificación por afinidad de los anticuerpos, en la que por ejemplo se acopló el fragmento de desaturasa C-terminal a una columna HiTrap NHS-activada.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por ejemplo según los métodos conocidos de Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) *Nature*, 349,293).

Aunque ya se han descrito delta-6 desaturasas de otros organismos, *Tetrahymena*, debido al rendimiento de espacio/tiempo especialmente alto en la producción de GLA, se ofrece tanto como punto de partida para la generación de cepas comercialmente significativas, sumamente productivas mediante métodos genéticos, como como fuente para los genes de la biosíntesis de PUFA. En la presente invención se describe de manera correspondiente la delta-6 desaturasa y su uso a partir de *Tetrahymena thermophila*, ciliados productores de GLA.

La modificación dirigida de la composición del espectro de ácidos grasos mediante métodos de ingeniería genética se describe en Napier *J et al.* (Curr. Opin. Plant Biol. (1999) 123-127), Murphy & Piffanelli (Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 67 (Plant Lipid Biosynthesis), (1998) 95-130) y Facciotti & Knauf (En: Adv. Photosynth. 6: Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Siegenthaler & Murata (Ed.) Kluwer Academia Publishers. Países Bajos. (1998) 225-248).

En los documentos W098/46763, W098/46764 y W098/46765 se describen desaturasas del hongo *Mortierella* y el uso de los genes para la producción de PUFA, así como algunas secuencias parcialmente parciales de desaturasas. En los documentos W093/06712 y W096/21022 se describen $\Delta 6$ desaturasas de una cianobacteria y de *Borago* así como el uso de estas secuencias para la producción de PUFA en cianobacterias y plantas. En el documento W099/27111 se describe una desaturasa de nemátodos y el uso para la producción de PUFA. También se conocen a partir de la bibliografía delta-6 desaturasas. Sin embargo, a este respecto se trata sobre todo de delta-6 desaturasas de plantas (*Borago* (Sayanova *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94:4211-4216), *Psycomitrella* (Girke *et al.* (1998) Plant-J. 1998 15 (1):39-48), girasol (Sperling *et al.* (1995) Eur. J. Biochem. 1995, 232:798-805)), hongos (*Mortierella*), animales (ratón, rata, *Caenorhabditis* (Napier *et al.* (1998) Biochem. J. 330 (2), 611-614)), cianobacteria (Reddy *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 1993, 293-300).

En general se tiene como objetivo la expresión heteróloga, funcional de estos genes en plantas de cultivo, especialmente semillas oleaginosas tales como por ejemplo colza, girasol y otras. Sin embargo los rendimientos de GLA son en casi todos los casos publicados o bien muy bajos y/o bien los organismos productores de GLA generados mediante ingeniería genética con actividad delta-6 desaturasa no tienen significado comercial (Knutzon & Knauf (1998) Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 67:287-304). Los problemas y dificultades para modificar de manera dirigida el espectro de ácidos grasos en plantas transgénicas se describen por ejemplo por Murphy (Current Opinion in Biotechnology (1999) 10:175-180) y Knutzon & Knauf (1998).

Debido al alto contenido en GLA de *Tetrahymena* descrito, es ventajoso utilizar los genes de la biosíntesis de PUFA de este organismo para el desarrollo de cepas comercialmente significativas, sumamente productivas mediante métodos de ingeniería genética. Mediante la posibilidad de cultivar bien *Tetrahymena* en cultivo en masa con una alta densidad celular, es además ventajoso utilizar la propia *Tetrahymena* para la generación de tales cepas comercialmente interesantes, sumamente productivas mediante métodos de ingeniería genética. Además pueden utilizarse además de *Tetrahymena* también otros organismos con ayuda del ácido nucleico según la invención para la producción de GLA u otros ácidos grasos delta-6 insaturados.

La producción de GLA mediante fermentación de *Tetrahymena* es especialmente ventajosa debido al espectro de ácidos grasos muy simple en comparación con los organismos superiores. Además una producción fermentativa no se ve influida por factores externos tales como el tiempo, oferta de alimentos, etc. Además, un producto obtenido de esta manera está libre en gran medida de impurezas, tales como por ejemplo las que pueden producirse en los productos obtenidos de la naturaleza mediante la contaminación ambiental.

Con ayuda de los ácidos nucleicos según la invención, que codifican para una delta-6 desaturasa específica de ciliados de *Tetrahymena*, pueden generarse organismos transgénicos que producen GLA y ácidos grasos delta-6 insaturados, o cuyo contenido en tales ácidos grasos con respecto a las células de tipo natural (en este caso: *Tetrahymena thermophila*) es claramente elevado (véanse las tablas 1 y 2). A este respecto se trata preferiblemente de ciliados, especialmente preferible *Tetrahymena*, que contienen la secuencia de ácido nucleico según la invención o la expresan de manera funcional. La expresión de la desaturasa de esta manera conduce a un aumento relativo de ácidos grasos delta-6 insaturados o productos sucesivos derivados de los mismos, basado en una concentración modificada de enzimas y sustratos de la síntesis de PUFA. La invención se emplea en la producción comercial de PUFA, especialmente de GLA y PUFA derivados del mismo u otros productos sucesivos que pueden derivarse de GLA, o ácidos grasos $\Delta 6$ -insaturados (véase la figura 1: biosíntesis de PUFA). Además de GLA también puede producirse así por ejemplo me-

diante la desaturación del ALA el ácido estearidónico (18:4 Δ 6,9,12,15), una materia prima utilizada con frecuencia industrialmente.

En una forma de realización especial, puede aumentarse, mediante el uso de los ácidos nucleicos según la invención que codifican para la delta-6 desaturasa en combinación funcional con secuencias reguladoras adecuadas y una expresión reforzada de la enzima, el contenido en GLA en organismos productores de GLA, o GLA en organismos productores de LA. A este respecto son de especial interés por ejemplo organismos que producen aceite tales como girasol, colza, soja pero también otros. Además pueden producirse mediante el uso simultáneo de por ejemplo una delta-12 desaturasa (por ejemplo, Sakuradani E *et al.* (1999) Eur. J. Biochem. 261:812-820, Okuley *et al.* Plant Cell (1994) 6(1) 147-58) los PUFA mencionados en organismos o células que no contienen o sólo contienen poco LA. Igualmente es posible una combinación de las tres desaturasas Δ 6, Δ 9 y Δ 12 que participan en la formación de GLA para la producción de GLA y ácidos grasos delta-6 insaturados. Además, la combinación con otros genes de la biosíntesis de PUFA (véase la figura 1) es otra realización preferida de la invención, transformándose el GLA y los ácidos grasos delta-6 insaturados por medio de otras enzimas, para las que GLA sirve como sustrato, mediante lo cual pueden producirse por ejemplo ARA (20:4) y otras moléculas que se derivan de GLA.

Además puede utilizarse la invención para la producción de nuevas fuentes de alimentos que contienen GLA o de fuentes de alimentos que son ricas en moléculas (especialmente PUFA, por ejemplo ARA), que pueden derivarse de GLA u otros ácidos grasos Δ 6 insaturados.

La presente invención describe además constructos de expresión que contienen el gen de delta-6 desaturasa o partes del mismo, así como la combinación funcional de la secuencia que codifica para delta-6 desaturasa con secuencias reguladoras heterólogas.

Otro objeto de la invención es la producción de organismos transgénicos con contenido en GLA aumentado (véanse las tablas 1 y 2), mediante el uso de la secuencia de ADN que codifica para delta-6 desaturasa descrita y de los constructos funcionales descritos del gen de delta-6 desaturasa.

Para el aislamiento de ADN genómico y de ARNm, así como la producción de bancos de ADNc y genómico se conocen un gran número de métodos bien establecidos (por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY). La producción de vectores adecuados, que contienen la desaturasa descrita en la invención o partes de la misma, puede llevarse a cabo con los métodos conocidos por el experto, tales como se describen por ejemplo en Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.* (1995), Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Nueva York) y Sambrook *et al.* (1989).

Los vectores que contienen la secuencia que codifica para delta-6 desaturasa pueden introducirse en las células mediante infección, transfección, electroporación, bombardeo de partículas y otros métodos. Por transformación se quiere decir en este caso en general la introducción de ADN foráneo en una célula. Los métodos para esto está bien establecidos y pueden realizarse de manera conocida para el experto (por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989), Potrykus I (1991) Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol. 42:205-225, Christou P (1993) Curr. Opp. Biotech. 4:135-141).

Igualmente se describen vectores que contienen la secuencia de ADN de la presente invención o partes de la secuencia en combinación funcional con promotores, u otros elementos reguladores que son activos en una célula huésped. En una realización preferida, en el caso de estos elementos reguladores, se trata de secuencias de ácido nucleico que son funcionalmente activas en ciliados, especialmente *Tetrahymena*, tales como por ejemplo los promotores para histona H4, α - y β -tubulina y otros.

Además, en la presente invención se describen organismos que expresan de manera recombinante la secuencia que codifica para delta-6 desaturasa descrita. Debido a esto, además de la posibilidad de la producción de PUFA Δ 6 en estos organismos, también existe por ejemplo la posibilidad de aislar la delta-6 desaturasa recombinante o partes de la misma mediante métodos convencionales de la purificación de proteínas (por ejemplo, Ausubel *et al.* (1995)). Pueden producirse vectores para una expresión de la secuencia que codifica para delta-6 desaturasa en diferentes organismos según modos conocidos por el experto. Información detallada sobre vectores adecuados se encuentra en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989), Goeddel, Ed. (1990) Methods in Enzymology 185 Academic Press, y Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, Inc. Tales vectores contienen preferiblemente elementos de secuencia que influyen en la expresión, tales como promotores, elementos potenciadores, secuencias que activan "en el sentido de 5'" etc. Para la expresión son adecuados promotores tanto constitutivos como inducibles, o por ejemplo promotores específicos de tejido. Para la expresión en células vegetales es adecuado por ejemplo el promotor 35S del "virus del mosaico de la coliflor" (VMC) (Restrepo *et al.* (1990) Plant Cell 2 987) o por ejemplo promotores que se activan en el desarrollo de las semillas.

Preferiblemente, en el caso de los vectores utilizados se trata de vectores lanzadera (Wolk *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1561-1565, Bustos *et al.* (1991) J. Bacteriol. 174:7525-7533).

En una forma de realización preferida se expresa el ácido nucleico según la invención bajo el control de un promotor fuerte (tal como por ejemplo el promotor de β -tubulina de *Tetrahymena*, Gaertig *et al.* (1999) Nature Biotech.) en *Tetrahymena*. La transformación puede tener lugar preferiblemente según métodos descritos por Gaertig *et al.* (1999) Nature Biotech. 17:462-465 (o por ejemplo según Gaertig & Gorovsky (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9196-

9200). Como elementos reguladores para la expresión pueden utilizarse por ejemplo los promotores de α - y β -tubulina de *Tetrahymena thermophila*. Las *Tetrahymena* transformadas se identifican, se acumulan y se cultivan en medios selectivos. A partir de las células pueden aislarse los lípidos/lipoides según métodos convencionales (por ejemplo, Dahmer *et al.*, (1989) Journal of American Oil Chemical Society 66,543). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden analizarse mediante cromatografía de gases.

Los ácidos nucleicos aislados descritos en la presente invención o partes de los mismos pueden utilizarse también para el aislamiento de los genes semejantes a partir de otros organismos, especialmente por ejemplo a partir de otros protistas, especialmente ciliados. Para el aislamiento de genes homólogos puede utilizarse el ácido nucleico según la invención o partes del mismo como sonda marcada. Mediante la hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos aislados a partir de otros organismos pueden identificarse y aislarse secuencias ácido nucleico homólogas. El marcaje de la sonda puede realizarse de una manera conocida por el experto (Ausubel, Sambrook (citado anteriormente)). Para el marcaje de la sonda son adecuados por ejemplo nucleótidos radioactivos o nucleótidos que están enlazados con moléculas detectables tales como por ejemplo moléculas fluorescentes, digoxigenina, biotina, enzimas o moléculas magnéticas. La identificación y el aislamiento de secuencias de ADN homólogas tiene lugar mediante la detección del marcaje después de una hibridación de la sonda con ADN heterólogo. Para la búsqueda de secuencias homólogas son apropiados los bancos de ADNc o bancos genómicos. Además, para la detección de secuencias homólogas son adecuadas las transferencias de tipo Southern y de tipo Northern. Alternativamente, puede aislarse ADN homólogo que se hibrida con la sonda marcada también mediante la retención selectiva de la sonda marcada (por ejemplo con ayuda de un imán).

El aislamiento y la clonación de los genes homólogos mediante hibridación cruzada puede tener lugar mediante métodos conocidos por el experto, tales como se describen por ejemplo en Ausubel *et al.* (1995, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Nueva York) o Sambrook *et al.* (1989, Molecular Cloning).

Basándose en la secuencia de ADN aislada y la secuencia proteica codificada por ésta pueden diseñarse además oligonucleótidos, con la ayuda de los cuales pueden amplificarse secuencias de ácido nucleico homólogas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Otra posibilidad para el aislamiento de proteínas homólogas consiste en la detección con anticuerpos específicos frente a la proteína codificada por la secuencia de la presente invención o partes de la misma (por ejemplo anticuerpos antipeptidos).

Descripción de las figuras y secuencias más importantes

- SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica para delta-6 desaturasa de la delta-6 desaturasa de *Tetrahymena thermophila*. Están subrayados el codón de iniciación y el codón de terminación.
- SEQ ID NO: 2: Secuencia proteica derivada de la SEQ ID NO: 1 de la delta-6 desaturasa de *Tetrahymena*, teniendo en cuenta el uso de codones de ciliados especiales (Wuitschick JD, Karrer KM (1999), o CUTG (*Codon usage tabulated from Genbank*, uso de codones tabulados de Genbank): <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>).
- SEQ ID NO: 3: Secuencia de nucleótidos genómica de la delta-6 desaturasa de *Tetrahymena thermophila*.
- Figura 1: Representación esquemática de la biosíntesis de PUFA.
- Figura 2: Resultado de una comparación de banco de datos mediante BLASTP de la secuencia proteica según la SEQ ID NO: 2 con bancos de datos de proteínas.
- Figura 3: Alineación de la secuencia proteica según la SEQ ID NO: 2 con desaturasas conocidas.
- Figura 4: Alineación múltiple de la secuencia polipeptídica según la SEQ ID NO: 2 a partir de *Tetrahymena* con desaturasas conocidas. Las cajas de histidina así como el motivo de HPGG conservado a partir del dominio de citocromo b5 están subrayados.
- Figura 5: Representación esquemática de la estructura génica de la delta-6 desaturasa de *Tetrahymena* según las SEQ ID NO: 1 y 3.
- Figura 6: Producción del constructo de expresión de delta-6 desaturasa pBDES6.
- Figura 7: Producción del constructo de desactivación pgDES6::neo.
- Figura 8: Comparación del espectro de ácidos grasos (ácidos grasos principales) de los transformantes de pBDES6 de *Tetrahymena* (AX601 y AX604) en comparación con la cepa de tipo natural de *Tetrahymena* (CU522).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para aclarar la invención sin limitar la invención a estos ejemplos.

5 Ejemplo 1

Organismos y condiciones de cultivo

Se cultivaron *Tetrahymena thermophila* (cepas B1868 VII, B2086 II, B*VI, CU427, CU428, CU522, facilitadas por el Dr. J. Gaertig, Universidad de Georgia, Atenas, GA, EE.UU.) en medio SPP modificado (proteosa-peptona al 2%, extracto de levadura al 0,1%, glucosa al 0,2%, Fe-EDTA al 0,003% (Gaertig *et al.* (1994) PNAS 91:4549-4553)) o medio de leche desnatada (leche desnatada en polvo al 2%, extracto de levadura al 0,5%, glucosa al 1%, Fe-EDTA al 0,003%) o medio MYG (leche desnatada en polvo al 2%, extracto de levadura al 0,1%, glucosa al 0,2%, Fe-EDTA al 0,003%) con la adición de disolución de antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml (medio SPPA)) a 30°C en un volumen de 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con agitación (150 r.p.m).

Se reprodujeron y se seleccionaron plásmidos y fagos en XL1-Blue MRF', TOP10F' o JM109 de *E. coli*. El cultivo de las bacterias tuvo lugar en condiciones convencionales en medio LB o NZY, con antibióticos en concentraciones convencionales (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Nueva York).

Ejemplo 2

25 *Producción de una biblioteca de ADNc de Tetrahymena thermophila*

Se aisló ARN completo a partir de *Tetrahymena thermophila* según el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (Chomzynski & Sacchi (1987) Anal. Biochem. 161:156-159). A partir del ARN completo se aisló el ARNm con ayuda de perlas Oligotex-dT (Qiagen). La síntesis de ADNc tuvo lugar según el kit de síntesis y clonación de ADNc ZAP Express de Stratagene. Después de la ligación del adaptador EcoR I y la digestión con Xho I se separó y se fraccionó según el tamaño el ADN a través de un gel de agarosa (S: 500-1500 pb, B: más de 1500 pb). Se aisló el ADN a partir del gel (Qiaquick Gel Extraktion Kit, (kit de extracción en gel), QIAGEN) y se ligó en el vector de ZAP Express cortado con Eco RI y Xho I. Se empaquetó *in vitro* el ADN ligado en fagos (Stratagene Gigapack III Gold) y se reprodujeron los fagos en XL1-Blue MRF' de *E. coli*. El banco de S-ADNc contenía aproximadamente 5×10^5 clones con un tamaño de inserto promedio de 1,1 kb, el banco de B-ADNc contenía aproximadamente 6×10^4 clones con un tamaño de inserto promedio de 2 kb.

Ejemplo 3

40 *RT-PCR con cebadores específicos para delta-6 desaturasa*

Mediante la comparación de secuencias de las desaturasas conocidas pudieron identificarse las regiones conservadas. Para las zonas de aminoácidos especialmente muy conservadas WWKWNHNAHH (SEQ ID NO: 4) y GGLQFQIEHHLFP (SEQ ID NO: 5) se diseñaron cebadores para PCR teniendo en cuenta el uso especial de codones de ciliados o codones de *Tetrahymena* (Wuitschick JD, Karrer KM (1999) Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. J. Eukaryot. Microbiol. 46 (3):239-47; Martindale (1989) J. Protozool. 36, 1:29-34, CUTG, (Codon Usage Tabulated from Genbank): <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>).

50 Cebador 1 (sentido): 5'-TGGTGGAARTGGAMNCAYAA-3', (SEQ ID NO: 6)
Cebador 2 (antisentido): 5'-CGDGGRAANARRTGRGTGTTTC-3' (SEQ ID NO: 7).

55 Se utilizaron 100 ng de ARNm aislado para la síntesis de cadena primaria con la transcriptasa inversa del VMA (Boehringer Mannheim). La reacción tuvo lugar según el protocolo del fabricante en un volumen de 20 µl: Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), MgCl₂ 8 mM, KCl 30 mM, DTT 1 mM, dNTPs 1 mM, 2 pmol de cebador de anclaje de Oligo-dT (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3'; SEQ ID NO: 8), 2 unidades de transcriptasa inversa del VMA, 60 min. a 55°C, a continuación 10 min. 65°C. Se utilizó para la PCR 1/10 de esta reacción de cadena primaria. La PCR tuvo lugar en un volumen de 25 µl con: 1 x tampón para PCR de Qiagen HotStarTaq (QIAGEN), pH 8,7 (20°C), 10 pmol de cada uno de los cebadores específicos para delta-6 desaturasa, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 1 unidad de polimerasa de HotStarTaq (Qiagen). Se realizó la PCR en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min., seguido a continuación por 35 ciclos con en cada caso 94°C durante 30 s, 45°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. Finalmente 10 min. 72°C. Se ligaron los fragmentos de PCR mediante clonación T/A (Invitrogen) en el vector pCR 2.1 y se reprodujeron en TOP10F' de *E. coli* (Invitrogen). Se aisló ADN de plásmido de clones positivos (Qiaprep Spin, QIAGEN) y se secuenció.

ES 2 299 433 T3

Ejemplo 4

Aislamiento del ADNc completo que codifica para delta-6 desaturasa

5 Basándose en la secuencia así identificada se diseñaron nuevos oligonucleótidos para la PCR:

Cebador d6/1-F (sentido): 5'-GGAATCACAATCAACATCATATGTTTCAC-3' (SEQ ID NO: 9) y

10 Cebador d6/1-R (antisentido): 5'-CTTCGTCCTTTAGAAATGTTGTTTGTGAAC-3' (SEQ ID NO: 10).

El aislamiento del ADNc completo que codifica para delta-6 desaturasa tuvo lugar mediante PCR con estos cebadores en combinación con cebadores (T3 y T7) específicos de vectores del banco de ADNc. Del banco de ADNc se utilizaron 2 μ l (10⁵ ufp/ μ l) para una PCR (véase anteriormente). La PCR tuvo lugar de manera diferente a las condiciones indicadas anteriormente según el siguiente protocolo: desnaturalización 15 min. 95°C, a continuación 35 ciclos con 20 s 94°C, 20 s 57°C, 1 min. 72°C. Finalmente 10 min. 72°C. Se secuenciaron los productos de PCR con los cebadores utilizados también para la PCR. Basándose en la información de secuencia así obtenida se diseñó un nuevo cebador que se encontraba en el extremo 5' de la secuencia de ADNc:

20 Cebador d6-5'-F: AGTAAGCAAATAAATTTAAAAACAAGC (SEQ ID NO: 11)

Con ayuda de este cebador en unión con un cebador específico de vector pudo amplificarse y aislarse la secuencia de ADN completa mediante PCR (condiciones de PCR, véase anteriormente). Mediante la clonación de este producto de PCR en el vector pCR 2.1 se obtuvo el plásmido pDES6.

25 Ejemplo 5

Producción de una biblioteca de ADN genómico de Tetrahymena thermophila

30 Se aisló ADN genómico con ayuda del método de la urea (Gaertig *et al.* 1994) a partir de *Tetrahymena* y se cortó con Eco RI. El ADN cortado se ligó en un vector lambda igualmente cortado con Eco RI (Zap Express, Stratagene). La realización posterior correspondió al modo de proceder en el caso de la biblioteca de ADNc.

Ejemplo 6

35 *Aislamiento de la secuencia genómica de delta-6 desaturasa*

Se identificó la secuencia genómica de delta-6 desaturasa con ayuda de la PCR. Por un lado se generó un producto de PCR de aproximadamente 2200 pb de tamaño a partir del ADN genómico con cebadores de los extremos 5' y 3' del ADNc: d6-5'-F: AGTAAGCAAATAAATTTAAAAACAAGC (SEQ ID NO: 12) d6-3'-R: GGTCCTTCAT GAATCTTAAGGTTCCACTTC (SEQ ID NO: 13), que contenía la secuencia codificante completa e intrones. Para aislar las secuencias flanqueantes del gen de delta-6 desaturasa se utilizó el sistema Genome Walker (Clontech). Con ayuda de los cebadores universales de este sistema y los cebadores específicos basándose en la secuencia de delta-6 desaturasa identificada d6-5'-R: CTTAAGTCTTATCAACTCCCATAATGC (SEQ ID NO: 14) d6-3'-F: GAAGTG GAACCTTAAGATTCATGAAGGACC (SEQ ID NO: 15) pudieron aislarse las regiones flanqueantes del gen de delta-6 desaturasa de *Tetrahymena*. En la figura 5 se representa la estructura completa de la secuencia genómica.

Ejemplo 7

50 *Producción de los constructos de expresión pBDES6*

El vector pBICH3 (Gaertig *et al.* 1999 Nature Biotech. 17:462-465) contiene la secuencia codificante de la pre-proteína de antígeno I (G1) de *Ichthyophthirius*, flanqueada por las secuencias reguladoras no codificantes del gen BTU-1 de *Tetrahymena thermophila*. Se utilizó un plásmido (pBICH3-Nsi) modificado con un sitio de corte Nsi I al inicio (facilitadas por J. Gaertig, Universidad de Georgia, Atenas, GA, EE.UU.) para producir el constructo de expresión pBDES6 de delta-6 desaturasa. Para esto se insertaron sitios de corte Nsi I y Bam HI por medio de PCR al inicio y al final de las secuencias codificantes de delta-6 desaturasa de *Tetrahymena*. Para la PCR se utilizaron como moldes plásmidos (pDES6) aislados que contienen las secuencias de ADNc completas de delta-6 desaturasa. Los cebadores D6-Nsi-F: 5'-GCATTATGCATGTTGATAAGACTTAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 16) D6-Bam-R: 5'-TATG GATCCTCAAAGGTGAGATTTTTCAAAAATAG-3' (SEQ ID NO: 17) generaron productos de PCR que contenían la secuencia codificante completa de la delta-6 desaturasa, flanqueada por los sitios de corte Nsi I y Bam HI. Se cortaron los productos de PCR y el plásmido pBICH3-Nsi con las enzimas de restricción Nsi I y Bam HI, se purificaron a través de un gel de agarosa y se ligaron (véase la figura de construcción de plásmido). Los constructos de expresión pBDES6 así producidos contenían la secuencia completa que codifica para delta-6 desaturasa insertada en un marco de lectura correcto en las secuencias reguladoras del gen BTU1 (véase la figura 6). Para la transformación de *Tetrahymena* se linealizaron los constructos mediante una digestión con las enzimas de restricción Xba I y Sal I. En el caso de una transformación eficaz se sustituyó el gen BTU1 por este constructo mediante recombinación homóloga, mediante lo cual se proporcionó una resistencia de las células frente a paclitaxel.

ES 2 299 433 T3

Ejemplo 8

Determinación del espectro de ácidos grasos de los transformantes

5 La determinación del espectro de ácidos grasos tuvo lugar por medio de cromatógrafos de gases (HP GC 6890) con detector de ionización de llama (Hewlett-Packard Company, Wilmington, EE.UU.). Como columna sirvió una FFAP (*Free Fatty Acid Phase*, fase de ácido graso libre) Permbond (Macherey & Nagel GmbH, Düren). La identificación de los ácidos grasos tuvo lugar mediante la comparación de tiempos de retención de patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos. Basándose en la concentración conocida del patrón pudo determinarse la concentración de los ácidos grasos en la muestra.

15 Para la determinación del espectro de ácidos grasos se cultivaron los transformantes aislados en medio MYG a 30°C, 150 r.p.m. durante 24-96 h. Se centrifugaron 50 ml del cultivo a 1500 g durante 15 min., se descartó el sobrenadante, se congeló el sedimento a -80°C y a continuación se liofilizó. Se pesaron 50 mg de la muestra liofilizada y se mezclaron con 1 ml de HCl metanólico al 20% y 1 ml de disolución de patrón metabólico (1 mg/ml). Para la liberación de los ácidos grasos y su esterificación para dar ésteres metílicos de ácidos grasos se agitaron las muestras en tubos de ensayo cerrados durante dos horas a 60°C en un baño de agua y se enfriaron hasta temperatura ambiente. Para neutralizar la muestra se añadió a continuación 1 ml de disolución acuosa, saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se mezcló con cuidado. Mediante la adición de n-hexano se extrajeron los ésteres metílicos de ácidos grasos. 20 A continuación se mezcló vigorosamente la mezcla básica y mediante centrifugación durante 2 min. a 4300 r.p.m. se consiguió una separación de fases. Se eliminó aproximadamente 2/3 de la fase orgánica superior y se inyectó 1 µl de la muestra en la columna de CG y se analizó.

TABLA 1

25 *Contenido en GLA de los transformantes de pBDES6 de Tetrahymena (AX601 y AX604) en comparación con la cepa de tipo natural de Tetrahymena (CU522) después de 50 h de cultivo. Se indica la proporción porcentual de GLA en el espectro total de ácidos grasos así como la diferencia porcentual de los transformantes en comparación con la cepa CU522 de Tetrahymena no transformada*

Cepa (plásmido)	% de área de GLA	Diferencia con respecto a CU522
CU522 (-)	24,0	-
AX601 (pBDES6)	31,7	+32%
AX604 (pBDES6)	29,3	+22%

TABLA 2

40 *Comparación del espectro de ácidos grasos (ácidos grasos principales) de los transformantes de pBDES6 de Tetrahymena (AX601 y AX604) en comparación con la cepa (CU522) de tipo natural de Tetrahymena después de 50 h de cultivo. Se indica la proporción porcentual de los ácidos grasos principales en el espectro total de ácidos grasos, así como la razón de los ácidos grasos principales saturados con respecto a los insaturados*

Ácidos grasos	Cu522 (-)	AX601 (pBDES6)	AX604 (pBDES6)
C14:0	9,4	7,2	7,4
C14:1	2,8	3,5	3,1
C16:0	12,7	7,3	7,2
C16:1	4,5	6,4	6
C18:0	2,6	-	1,4
C18:1	9,5	3,9	4,8
C18:2	9,4	11,5	10,6
GLA (C18:3)	24	31,7	29,3
Insaturado	50,2	57	53,8
Saturado	24,7	14,5	16
Insaturado/Saturado	2,03	3,93	3,36

ES 2 299 433 T3

Los transformantes muestran en estas condiciones un aumento de la proporción de GLA en de aproximadamente un 22-32% en el espectro total de ácidos grasos en comparación con la cepa CU522 no transformada (tabla 1). Además del desplazamiento de la proporción de GLA es obvio un claro desplazamiento del espectro de ácidos grasos hacia un contenido más alto en ácidos grasos insaturados. La razón de los ácidos grasos (principales) insaturados con respecto a los saturados se duplica en el caso de los transformantes (tabla 2).

Ejemplo 9

Producción del constructo de desactivación pgDES6::neo de delta-6 desaturasa

Para la producción del constructo de desactivación se insertó en la secuencia genómica de delta-6 desaturasa un casete neo del plásmido p4T2-1ΔH3 (Gaertig *et al.* (1994) Nucl. Acids Res. 22:5391-5398). A este respecto se trata del gen resistente a neomicina bajo el control del promotor de histona H4 de *Tetrahymena* y la secuencia flanqueante en el sentido de 3' del gen BTU2. Este constructo proporciona en *Tetrahymena* una resistencia frente a paromomicina. Se cortó el plásmido p4T2-1ΔH3 con Eco RV/Sma I y el fragmento de aproximadamente 1,4 kb de tamaño del casete neo se ligó en el plásmido pgDES6 cortado con Eco RV en la secuencia genómica de la delta-6 desaturasa de *Tetrahymena* (véase la figura 8). Mediante esto se generó el plásmido pgDES6::neo. En una transformación eficaz se sustituyó el gen para la delta-6 desaturasa por este constructo mediante recombinación homóloga, mediante lo cual se proporcionó a las células una resistencia frente a paromomicina.

Ejemplo 10

Transformación del macronúcleo de Tetrahymena con el constructo de expresión pBDES6 de desaturasa

Para una transformación se utilizaron 5×10^6 células (CU522) de *Tetrahymena thermophila*. El cultivo de las células tuvo lugar en 50 ml de medio SPPA a 30°C en un matraz Erlenmeyer de 250 ml en un agitador a 150 r.p.m. hasta que se obtuvo una densidad celular de aproximadamente $3-5 \times 10^5$ células/ml. Se sedimentaron las células mediante centrifugación (1200 g) durante 5 min. y se resuspendió el sedimento celular en 50 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se centrifugó como anteriormente. Se repitió esta etapa de lavado y se resuspendieron las células en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5, más antibióticos) a una densidad celular de 3×10^5 células/ml, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubaron durante 16-20 h sin agitación a 30°C (fase de inanición). Después de la fase de inanición se determinó de nuevo el número de células, se centrifugó tal como anteriormente y se ajustaron las células con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) hasta una concentración de 5×10^6 células/ml. Se utilizó un ml de las células para la transformación. La transformación tuvo lugar por medio de un bombardeo de micropartículas (véase a continuación). Para la regeneración se absorbieron las células en medio SSPA y se incubaron a 30°C sin agitación en el matraz Erlenmeyer. Después de 3 h se añadió Paclitaxel® en una concentración final de 20 μM y se transfirieron las células en alícuotas de 100 μl a placas de microtitulación de 96 pocillos. Se incubaron las células en una caja húmeda, sin luz a 30°C. Después de 2-3 días pudieron identificarse clones resistentes a paclitaxel. Se inocularon clones positivos en medio nuevo con 25 μl de paclitaxel. Mediante el cultivo de las células en concentración creciente de Paclitaxel (hasta 80 μM) se consiguió una "colección fenotípica" completa (Gaertig & Kapler (1999)).

Para el análisis de los clones se pusieron aproximadamente 4 ml de cultivos en SPPA con paclitaxel, se aisló el ADN (Jacek Gaertig *et al.* (1994) PNAS 91:4549-4553) y se amplificó mediante PCR el ADN integrado en el locus BTU1. Como cebadores sirvieron los cebadores específicos de BTU1 BTU1-5'F (AAAAATAAAAAAGTTT GAAAAAACCTTC, aproximadamente 50 pb antes del codón de iniciación, SEQ ID NO: 18) y BTU1-3'R (GTT TAGCTGACCGATTTCAGTTC, 3 pb después del codón de terminación, SEQ ID NO: 19). Se analizaron los productos de PCR sin cortar y cortados con Hind III o Eco RV (pBDES6) o Eco RI (pBDES9) en un gel de agarosa al 1%. Se verificó la "colección fenotípica" completa a través de RT-PCR con los cebadores específicos de BTU1 (Gaertig & Kapler (1999)).

Ejemplo 11

Transformación del micronúcleo y del macronúcleo de Tetrahymena con el constructo de desactivación pgDES6::neo

Se cultivaron cepas de *Tetrahymena* de distintos tipos de apareamiento (CU428 VII y B2086 II) por separado en medio SPPA a 30°C con agitación (150 r.p.m.) en un matraz Erlenmeyer. A una densidad celular de $3-5 \times 10^5$ células/ml se centrifugaron (1200 g) las células durante 5 min. a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces con 50 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y posteriormente se resuspendieron en 50 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se mezclaron con disolución de antibióticos. Se incubaron las células en un matraz Erlenmeyer a 30°C sin agitación. Después de aproximadamente 4 h se contaron de nuevo ambos cultivos y se diluyeron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) hasta 3×10^5 células/ml, se incubaron durante 16-20 h adicionales a 30°C. Después de esta fase de inanición se mezcló de ambos cultivos el mismo número de células (absoluto) en un matraz Erlenmeyer de 2 l. Se incubaron las células a 30°C (inicio de la conjugación) y después de 2 h se determinó la eficacia de la conjugación. Para una transformación eficaz debían encontrarse en este momento aproximadamente el 30% de las células como parejas.

Para la transformación del micronúcleo se centrifugaron 3 h, 3,5 h, 4 h y 4,5 h después del inicio de la conjugación en cada caso 1×10^7 células conjugadas (5×10^6 pares) durante 5 min. a 1200 g y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5).

ES 2 299 433 T3

Para la transformación de la nueva disposición del macronúcleo se centrifugaron las células 11 h después del inicio de la conjugación tal como anteriormente y se resuspendieron en Tris-HCl. La transformación tuvo lugar por medio de un bombardeo de micropartículas (véase a continuación).

- 5 Para el cultivo de mutantes de desactivación de delta-6 desaturasa se añadieron al medio aceite de borraja 200 $\mu\text{g/ml}$ (GLA al 20-25%; SIGMA).

Mediante la selección para la resistencia a paramomicina pudieron identificarse las células transformadas. En la transformación del micronúcleo se añadió paramomicina (concentración final 100 $\mu\text{g/ml}$) 11 h después del inicio de la conjugación y se distribuyeron las células en alícuotas de 100 μl en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se incubaron las células en una caja húmeda a 30°C. Después 2-3 días pudieron identificarse los clones resistentes. Ciertos transformantes del micronúcleo pudieron distinguirse de los transformantes del macronúcleo debido a la resistencia frente a 6-metilpurina. En la transformación del macronúcleo se añadió paramomicina (concentración final 100 $\mu\text{g/ml}$) aproximadamente 4 h después de la transformación y se distribuyeron las células en alícuotas de 100 μl en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se incubaron las células en una caja húmeda a 30°C. Después 2-3 días pudieron identificarse los clones resistentes. Se inocularon clones positivos en medio nuevo con paramomicina 120 $\mu\text{g/ml}$. Mediante el cultivo de las células en esta alta concentración de paramomicina se consiguió después de algunas generaciones una “colección fenotípica” completa (Gaertig & Kapler (1999)).

- 20 Mediante el cruzamiento de los transformantes del micronúcleo con una cepa B*VI pudieron producirse mutantes de desactivación homocigóticos (Bruns & Cassidy-Hanley, *Methods in Cell Biology*, volumen 62 (1999) 229-240).

Ejemplo 12

- 25 *Transformación biolística (bombardeo de micropartículas)*

La transformación de *Tetrahymena thermophila* tuvo lugar por medio de la transformación biolística, tal como se describe en Bruns & Cassidy-Hanley (*Methods in Cell Biology*, volumen 62 (1999) 501-512); Gaertig *et al.* (1999) *Nature Biotech.* 17:462-465) o Cassidy-Hanley *et al.* ((1997) *Genetics* 146:135-147). El manejo del sistema de administración de partículas Biolistic® PDS-1000/He (BIO-RAD) está descrito detalladamente en el manual correspondiente.

- 30 Para la transformación se cargan 6 mg de partículas de oro (0,6 μm ; BIO-RAD) con 10 μg de ADN de plásmido linealizado (Sanford *et al.* (1991) *Biotechniques* 3:3-16; Bruns & Cassidy-Hanley (1999) *Methods in Cell Biology*, volumen 62: 501-512).

Preparación de las partículas de oro: se resuspendieron 60 mg de las partículas de oro de 0,6 μm (Biorad) en 1 ml de etanol. Para esto se mezclaron vigorosamente las partículas 3 veces cada una durante 1-2 min. en un vórtex. A continuación se centrifugaron las partículas durante 1 min. y se eliminó el sobrenadante con cuidado con una pipeta. Se resuspendieron las partículas de oro en 1 ml de agua estéril y se centrifugaron tal como anteriormente. Se repitió esta etapa de lavado una vez más, se resuspendieron las partículas en 1 ml de glicerol al 50% y se almacenaron en alícuotas de 100 μl a -20°C.

- 45 Preparación de la transformación: se almacenaron el soporte de macroportador, el macroportador y las pantallas de parada durante varias horas en etanol al 100%, los discos de ruptura en isopropanol. A continuación se puso un macroportador en el soporte del macroportador y se secó al aire.

Carga de las partículas de oro con ADN: todos los trabajos tuvieron lugar a 4°C. Se enfriaron en hielo las partículas de oro, el vector preparado, CaCl_2 2,5 M, espermidina 1 M, etanol al 70% y al 100%. Se añadieron 10 μl de ADN de vector linealizado (1 $\mu\text{g/ml}$) a 100 μl de partículas preparadas y se agitaron en vórtex con cuidado durante 10 s. A continuación se añadieron en primer lugar 100 μl de CaCl_2 2,5 M, se agitaron en vórtex durante 10 s y después se añadieron 40 μl de espermidina 1 M y se agitó en vórtex con cuidado durante 10 min. Después de la adición de 200 μl de etanol al 70% se agitaron en vórtex las partículas durante 1 min. y después se centrifugaron durante 1 min. a 10000 g. Se resuspendió el sedimento en 20 μl de etanol al 100%, se centrifugó y después se resuspendió en 35 μl de etanol al 100%.

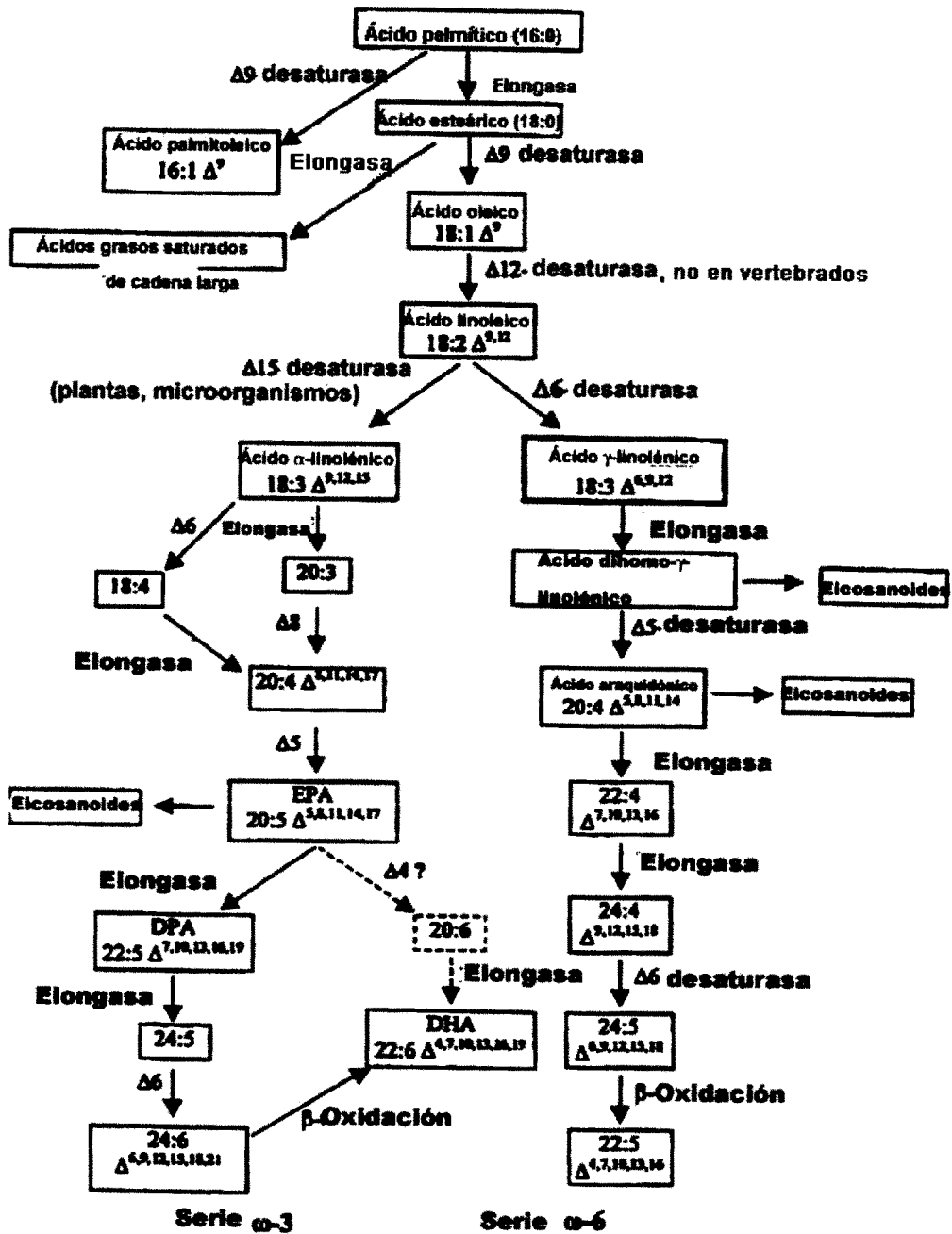
Las partículas así preparadas se añadieron con cuidado con una pipeta al centro de un macroportador. A continuación se almacenó el macroportador hasta la transformación en una caja con gel de sílice higroscópico.

- 60 Transformación: se añadió un ml de las células preparadas (véase anteriormente) en el medio de un filtro circular humedecido con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) en una placa petri y se puso en el soporte lateral más bajo de la cámara de transformación del sistema de administración de partículas Biolistic®. La transformación tuvo lugar con las partículas de oro preparadas a una presión de 900 psi (dos discos de ruptura de 450 psi) y un vacío de 27 pulgadas de Hg en la cámara de transformación. A continuación se transfirieron inmediatamente las células a un matraz Erlenmeyer con 50 ml de medio SPPA y se incubaron a 30°C sin agitación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico que codifica para delta-6 desaturasa de *Tetrahymena* con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 y partes del mismo con al menos 8 nucleótidos, que codifican para un polipéptido que presenta actividad delta-6 desaturasa.
- 10 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ácido nucleico se obtiene a partir de un ciliado.
- 15 3. Ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el ácido nucleico se obtiene a partir de *Tetrahymena thermophila*.
- 20 4. Ácido nucleico según la reivindicación 1-3, **caracterizado** porque el ácido nucleico es un ADN o ARN, preferiblemente un ADN bicatenario.
- 25 5. Ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el ácido nucleico es un ADN con una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 1 desde la posición 33 hasta la posición 1091.
- 30 6. Ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el ácido nucleico contiene una o varias secuencias no codificantes.
- 35 7. Ácido nucleico aislado según una de las reivindicaciones 1 a 6 según la SEQ ID NO: 3 y partes del mismo con al menos 8 nucleótidos, que codifican para un polipéptido que presenta actividad delta-6 desaturasa.
- 40 8. Ácidos nucleicos según una de las reivindicaciones 1-7, **caracterizados** porque el ácido nucleico está contenido en un vector, preferiblemente en un vector de expresión.
- 45 9. Vectores de expresión según la reivindicación 8, **caracterizados** porque el ácido nucleico se encuentra en combinación funcional con un promotor constitutivo y/o inducible y opcionalmente una señal de terminación.
- 50 10. Procedimiento para la producción de un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque el ácido nucleico se sintetiza químicamente o se aísla a partir de un banco de genes mediante una sonda.
- 55 11. Polipéptido con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 y partes del mismo con al menos 12 aminoácidos, que presentan actividad delta-6 desaturasa.
- 60 12. Procedimiento para la producción de un polipéptido según la reivindicación 11, **caracterizado** porque un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1-7 se expresa en un huésped o sistema de expresión adecuado.
- 65 13. Anticuerpo específico frente a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2.
14. Organismo no humano transgénico que contiene un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Ácido nucleico según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 1.
16. Ácido nucleico según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3.
17. Ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 7, **caracterizado** porque las partes comprenden al menos 15, preferiblemente 20 nucleótidos.
18. Ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 7, **caracterizado** porque las partes comprenden al menos 100 nucleótidos.

Fig. 1



BLASTP 2.0.8 (05-enero-1999)

Bibliografía: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Consultar delta-6 desaturasa de *I. thermophila* (352 letras)

Base de datos: /LION/data/db/fast/nrdb

387.705 secuencias; 119.829.732 letras totales

Secuencias que producen alineaciones significativas:

	Puntuación	Valor E
	(bits)	
trembl AF078796 AF078796_1 gene: "des-5"; product: "delta 5 fat...	79	4e-14
trembl AF031477 AF031477_1 product: "delta6-fatty-acid-desatura...	79	4e-14
trembl Z81122 CEY13F2_1 gene: "T13F2.1"; <i>Caenorhabditis elegans</i> ...	78	1e-13
trembl Z70271 CEW08D2_2 gene: "W08D2.4"; <i>Caenorhabditis elegans</i> ...	78	1e-13
trembl AF005096 AF005096_1 product: "desaturase/cytochrome b5 P...	70	3e-11
trembl AJ222980 FFAJ2980_1 gene: "des6"; product: "delta6-acyl-...	69	6e-11
trembl J079010 DQ079010_1 product: "delta 6 desaturase"; <i>Borago</i> ...	67	2e-10
trembl AC005397 AC005397_14 gene: "T3F17.14"; product: "potativ...	67	2e-10
trembl AF007561 AF007561_1 product: "delta 6-desaturase"; <i>Bora</i> ...	66	4e-10
trembl AF126799 AF126799_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	64	2e-09
trembl AF126798 AF126798_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	63	3e-09

trembl AF031194 AF031194_1 gene: "S276"; product: "S276"; Trit...	62	6e-09
trembl ne AB021980 AB021980_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	62	6e-09
trembl ne AL078610 SCH35_12 gene: "SCH35.42c"; product: "putati...	62	8e-09
trembl AJ224160 BNAJ4160_1 gene: "ald1"; product: "delta-8 sphi...	60	2e-08
trembl AC004770 AC004770_2 product: "BC269730_2"; Homo sapiens...	60	3e-08
trembl AJ224161 ATAJ4161_1 gene: "ald1"; product: "delta-8 sphi...	59	6e-08
trembl ne AL050118 HSM800210_1 gene: "DKF7p586C201"; product: "...	57	2e-07
trembl AB022097 AB022097_1 product: "delta 5 fatty acid desatur...	57	2e-07
trembl X87143 KACYTBSRN_1 product: "cytochrome b5 containing fu...	50	2e-05
trembl Y08460 MS0025_1 gene: "Hdes"; product: "Hdes protein"; ...	50	3e-05
trembl AF001394 AF001394_1 product: "fatty acid desaturase/cyto...	46	4e-04
trembl AF002668 HSAF2668_1 product: "HLO"; Homo sapiens putati...	46	5e-04
swiss Q08871 LLCD_SYNY3 LINOLEOYL-COA DESATURASE (EC 1.14.99.25...	43	0.003

Continuación de la figura 2

>segureseq|W95904|W95904 delta 6 desaturasa de Mortierella alpina. Longitud= 457
 Puntuación= 89,7 bits (219), esperada= 4e-18

Identidades= 102/422 (24%), Positivos= 152/422 (35%), Huecos= 88/422 (20%)

Consulta: 9 KIVLSEKLLMSTKIVKDTSTOCTYKAKNIBKQZLFLKLFZIDSDGDLTSTVCKLNS 60
 E + E R + + I + YD E+ KPG L +D S+ F F R
 Objeto: 19 KALNDCRKAQKAPFLAIIDKIVYVNEVFV--KPGSVILS---KVEDSTOVVDTNRP 73

Consulta: 69 KQALKILKSPFATGALGSETS--SSKQFSLKQDLKLLKFNWFIKIG----LFLTFTFLF 123
 + A + L +F + + + + F+ +EL+ LP+ + F +F L
 Objeto: 74 KANSTLANTVEDIDSRDRIDKDFALSVKSLKFLKFLGTYDSSKATZATVSNLC 133

Consulta: 124 YTCGLZ---QNI-----YFSLFLVLMQIISGTCISNHNMPILA----KFLAVY 168
 + G T KW S LL L GN+ E K++ R F
 Objeto: 134 INGLSTYVAVKQSTLANVLSAALALGFTWCCCLANDFLKQVYVQDFWOLFRAFL 193

Consulta: 169 AFLCCGFMKNCCKQKQKMPFMSILKQDIO--KDYLLKQ----- 208
 +C GFS+ WY KM KM N +D DI N N
 Objeto: 194 GWCQDPSQWQKQKMTKZAAAFVWQSPQIDTAVLAVKIKKLMKQVTVQSSATWQ 253

Consulta: 209 -----FP---FLFLAKELDGL-----ASTYFSGIFLALMNV 238
 FP F L N L SLL S + LA+RN
 Objeto: 254 SRNVLQGTFTFLSFLKLSKGLSILVFLKQAKFQKAVVLSLVKGLSLMKNFT 313

Consulta: 239 LLFQNTIV-----ILSELKAGITRNASILAVQKES--KSNFKLITLPTTEKQI 286
 F + ++ + G A + KE + E + + FF QI
 Objeto: 314 WFLAKFLFEDFVRELVTFLVGCATCCLLAVFLKLMKQKQFVLSKSAVQKQDFTTQI 373

Consulta: 287 AAKNYAFKDIIFSLKNGKQIQKMMFTTQIFVFLKLANVIAKELKQKELKIKKCP 346
 R+ +F+ GQ+ YD KM FP + + K + + K+S++ N +
 Objeto: 376 ITEDV-VKGLFAMFTTQKLTQIKMLLFPKQKQKQKQKQKQKQKQKQKQKQKQKQ 432

Consulta: 347 ST 348
 S
 Objeto: 433 IS 434

33

Fig. 3B

>tramb1|AF031477|AF031477_1 producto: "delta-6 ácido graso desaturasa";
 ARNm de delta-6 ácido graso desaturasa de *Caenorhabditis elegans*, cds completa //sp/AF031477/
 3088520 producto: "delta-6 ácido graso desaturasa"; ARNm de delta-6 ácido graso desaturasa de
Caenorhabditis elegans, cds completa, longitud= 443

Puntuación= 79,2 bits (192), esperada= 4e-14
 Identidades= 100/390 (25%), Positivos= 132/390 (33%), Huecos= 95/390 (24%)

Consulta: 41 KHEGELFLKLFIDEGQLNEVITLA--SQALKILKSPFTEAQIS--ETESSKR--- 93
 KHPGG D T F H S GA K L K G E E + KR
 Objeto: 28 KHPGCAVTEQY---RNSDATHITHAFTESGSAATKQDLAKKIDEDFLEKQLAEQDLAK 84

Consulta: 94 -----PSLAKKLAN--LFEHPPIBICLITITFTLAVTGLTQ 130
 F L+AL L + H + ++T ++ Q
 Objeto: 85 YDINWBYDVSVAGKRNVSFTLQQLDQGLNDEANSTYTLRALSISLINSATFTLQ 144

Consulta: 131 K--WYF-SIFLLVLRQISGHSNDR-----NPIAKVALVAVLCEGFSNKNRKA 183
 WY S LL L GW+ H E + P+ +L + GFS NW K
 Objeto: 145 YLGWYIFRACLALANQGFCHLTHETFCGFTTFRPLNDFISLFTGHTLQGFSDGNKDK 204

Consulta: 184 ENQENHTNMLKDEDI-----QHOYKLNQFFFLP 213
 EN EN TN I D DI QH Y P L
 Objeto: 205 RHTTHAATWVIDDGDIDLAPLAFIFGDCCKYKAFKSAIKLVYVQLYFTAKLPDLR 264

Consulta: 214 LAKKLDKILASYYE-----TEGIFLALNVLVFNQFTI-----VILS 251
 W S+ + E +E + HW +P Q F + I+8
 Objeto: 263 FSNFGOSVQNVVTEKQETKYVQSNATFQDITVCHNANVYQLLFTPLRVAVYIIS 324

Consulta: 252 ELIAGITRASIYLVCHHEKMF--EAKITLPTFHOIAMSNTAVTIDIFSLINGEMQTO 309
 +-+ G A +-+ NH + K+ KI F DI +NH L GS+ YQ
 Objeto: 325 QMEGOLLIAWVYTFHNSVDKYPANRILNIFALQILTTDRTTTPPIYDNL-WGGLWTO 383

Consulta: 310 TERNFTFPOIPFTLPLKARVIAEELKKNWL 339
 ENH FP +P L + E K+ NL
 Objeto: 384 IENHLFTTNPCHLNACTVYIVKCKENHL 413

Fig. 3C

>trembl/U79010/B0079010 1 producto: "delta 6 desaturasa"; ARNm de delta 6 desaturasa de *Borago officinalis*, cds completa //:sgp/U791010/2062403 producto: "delta 6 desaturasa"; ARNm de delta 6 desaturasa de *Borago officinalis*, cds completa. Longitud= 448

puntuación= 67,1 bits (161), esperada= 2e-10

Identidades= 100/414 (24%), Positivos= 154/414 (37%), Huecos= 100/414 (24%)

```

Consulta: 6  TQBEIVLAKLPELLMSTYTYKDTYDCTYAKSKMDFQGLFLMLFDKQDLTEYNT 65
Objeto:   6  T +E+ +EP + +YD + + + K KFGG L Q+ +T+ F
10  TSDLEKDKP ---COLMISIGSAYGVSDVVD--DFGSPFLAKLAG--QSYTDAVVA 62
Consulta: 66  LMSQALKILASFTYGAQGE---TFSSE-----MFSILKELKELFEHPPIE 112
Objeto:   66  K L F TG ++ +E SK + + EK +F I
63  FFEASTWELKQF-FTGYTLADYVSVSDVTDVLLVFEFSDMLYKSGCHINFTATCFIA 121
Consulta: 113  IGLPLTF-TLVTQCLTQWVTFIPLLVIAQISGICGEMHKA---NPIAKKALVY 160
Objeto:   113  + ++ + LF G L FS L+ + I SRIEN H + L KF ++
122  MLEPMSVYGVLFCEGLVB--LFSQCLAGTAVIQSGNIGCHINVSQGLKRNKICIF 179
Consulta: 169  APIC-GQFENKCKMCHMETHMILKSDIGN----- 202
Objeto:   169  A C G S W W H H H+ H+ + D D+Q+
180  RANCLSGISGHWKHHHANNIACHLSLSTDFDLGYTFIVVSSKFTGSLTSHFTYKULTF 239
Consulta: 203  -----DYKLVQFFTLFLKELDGLIASY-----TFPGIFLALMVL-- 240
Objeto:   203  Y+ W F + +L+ + S +E G + W L
240  DGLSRTVSTQMTTFPINCARKLWTVUSLMLLTKMVSYRAMELGLCVSIVIFLL 299
Consulta: 241  -----FQMTFIVLSLIAGF-----TSAAILVCHREHSGFERRITLPTTHQ 285
Objeto:   241  + + VI S + G FS+ + VG + FE+ + F +
300  VECLEPWRICLRIVIASLSTGQVFLMHTFSVTVGPKGMWITKQ--TQCTLDIS 358
Consulta: 286  IAAKSTATWDFLLINCGQTFQEMFTTQIFFTLPTAVIASELAKML 339
Objeto:   286  ++ FN GG+Q+Q EEE FT+ +F L K + E KK EL
359  GPFKDF-FH-----GGLQVIMMLFTRPKMLKLSLFTVILCKKJML 403
    
```


Fig. 3E

>swiss/Q08871/LLCD_SYNY3 LINDLEÓILO-COA DESATURASA (EC 1.14.99.29)
 (DELTA(6) DESATURASA. //trembl/L1421/SSD6DS_1 producto: "delta-6 desaturasa"; gen de delta-6 desaturasa de
Synechocystis sp., cds completa. //trembl/D90914/SSD914_112 gene: "des6"; producto: "delta-6 desaturasa"; genoma completo de
Synechocystis sp. PCC6803, 16/27, 1991550-2137258. //pironly/S35157/835157 Delta(6)-desaturasa-Synechocystis sp.
 //:gp/D90914/1653S89 gene: "des6"; producto "delta-6 desaturasa"; genoma completo de PCC6803 de *Synechocystis sp.*, 16/27,
 1991550-2137258. //:gp/L11421/349563 producto: "delta-6 desaturasa; gen de delta-6 desaturasa de *Synechocystis sp.*, cds
 completa. Longitud= 359

Puntuación= 43,4 bits (100), esperada= 0,003

Identidades = 63/288 (21%), Positivas= 101/288 (34%), Huecos= 61/288 (21%)

Consulta: 120 **FVLVTCCTQNTYDIFVLAFLVLAQIISGKICGNNR-----HP-ILKDTALVYALCOGF 175**
 F LP + L + + S +CH NN NP I R + Y + G

Objeto: 57 **FVLTAFTVFPVLLGCVLALAAAFVTVVGDAMNAYSSNFIKIVLCTIDV--GL 114**

Consulta: 176 **SKKNCQKQKQ--KMTYTHILAKSDIQSDIKLQDTFL-----FLKHLKDLKILAS 224**
 S+ N +MS ME +TH + D +I D + Y F W L +

Objeto: 115 **SDFLAKYRMYLMEYTHILGSDVEINSGAVNSFDSVGVTFQDTYKGLYLFPP 174**

Consulta: 225 **YTFEIOIFLAL-----MVLITMDITVIVLS-----ELIAGFTTSASILVG 265**
 Y+ ++L L N + F +L L GF +L+G

Objeto: 175 **YKLDIVLVLNGKYNKIKIPFPVLEKALGKIKLILGIVVGLFALGFTSIPETLIG 234**

Consulta: 266 **MDKDKKTKDGI-ILPPTK-----GIASVNTAINDIFGL 300**
 M + + 3+ N GI + M+A ++ F

Objeto: 235 **ASVYKDTGIVVCTIIEALNVLSSTVLPDGGKALDGMKICQKSTAMTATNTNPTFM 294**

Consulta: 301 **LINGKQIQKTHMIFTPQIFPLPFAVVIAREKIKMLKIKMGPITK 348**
 GQ+ +Q ME TP I P+ II + +++ ++ P P+

Objeto: 299 **WFCGLKQVYKMLFTWIKLHNTFQLEMLIDVCSGQVETVETPK 342**

Fig. 4

<i>M. Alpina</i>	1	-----MAAAPSVRTFRAEVLNA	AL	AKDAEAF	IL	AV	ML	RI	RP	---D
<i>C. elegans</i>	1	-----MARRQE	---	HEP	TK	GM	MC	DA	LR	---S
<i>B. officinalis</i>	1	-----MAAOKNYITSD	IK	HD	---	PG	LS	QG	AK	---D
<i>M. musculus</i>	1	-----MKGKGNQGGEGSTERCA	MP	TF	RE	AKHN	---	LRT	RV	---
<i>T. thermophila</i>	1	-----MGVOKTOE	---	IL	PELLN	IK	FK	YK	DT	---
<i>M. Alpina</i>	54	--SV	LL	HV	K	---	PEA	---	A	ET
<i>C. elegans</i>	34	--SA	T	AK	NM	---	IGS	KE	AV	Q
<i>B. officinalis</i>	45	--SFP	K	LA	Q	---	VTA	VA	PAS	---
<i>M. musculus</i>	57	--HRV	GH	SE	---	LA	LA	LD	LD	---
<i>T. thermophila</i>	46	--LAF	NL	I	DE	K	Y	L	SK	---
<i>M. Alpina</i>	100	----	FA	V	---	K	TL	FQ	Y	SS
<i>C. elegans</i>	91	----	NM	GF	NIS	K	SA	Q	N	K
<i>B. officinalis</i>	91	----	K	Y	---	K	V	F	S	K
<i>M. musculus</i>	105	----	K	S	O	I	T	E	F	---
<i>T. thermophila</i>	92	----	K	---	---	---	---	---	---	---
<i>M. Alpina</i>	146	---	QT	ST	L	A	---	---	---	---
<i>C. elegans</i>	146	---	LQ	Y	H	T	Y	---	---	---
<i>B. officinalis</i>	133	---	F	C	E	G	V	L	V	H
<i>M. musculus</i>	155	---	T	G	W	I	P	T	---	---
<i>T. thermophila</i>	126	---	CL	T	Q	K	W	---	---	---
<i>M. Alpina</i>	199	---	SS	---	---	---	---	---	---	---
<i>C. elegans</i>	205	---	SG	---	---	---	---	---	---	---
<i>B. officinalis</i>	186	---	I	---	---	---	---	---	---	---
<i>M. musculus</i>	207	---	A	---	---	---	---	---	---	---
<i>T. thermophila</i>	174	---	N	---	---	---	---	---	---	---

M. alpina
C. elegans
B. officinalis
M. musculus
T. thermophila

M. alpina
C. elegans
B. officinalis
M. musculus
T. thermophila

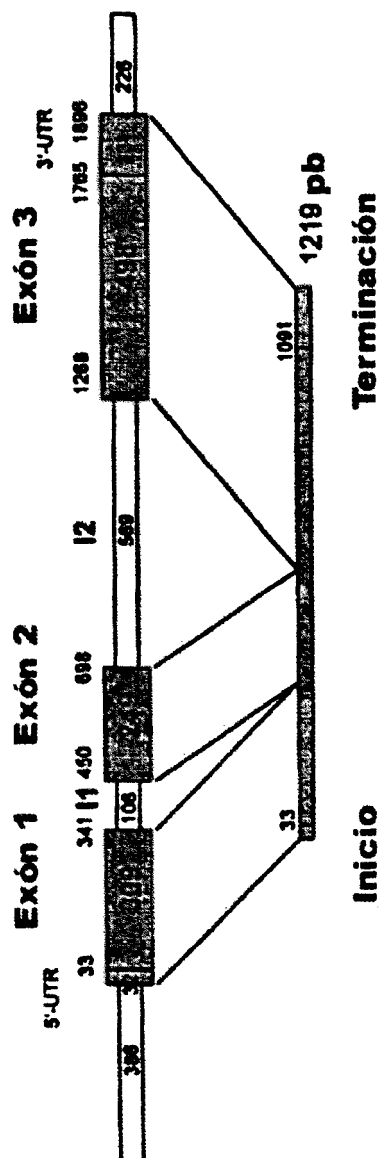
M. alpina
C. elegans
B. officinalis
M. musculus
T. thermophila

M. alpina
C. elegans
B. officinalis
M. musculus
T. thermophila

Continuación de la figura 4

Fig. 5

ESTRUCTURA DEL GEN DE $\Delta 6$ DESATURASA



PRODUCCIÓN DEL CONSTRUCTO DE EXPRESIÓN pBDES6

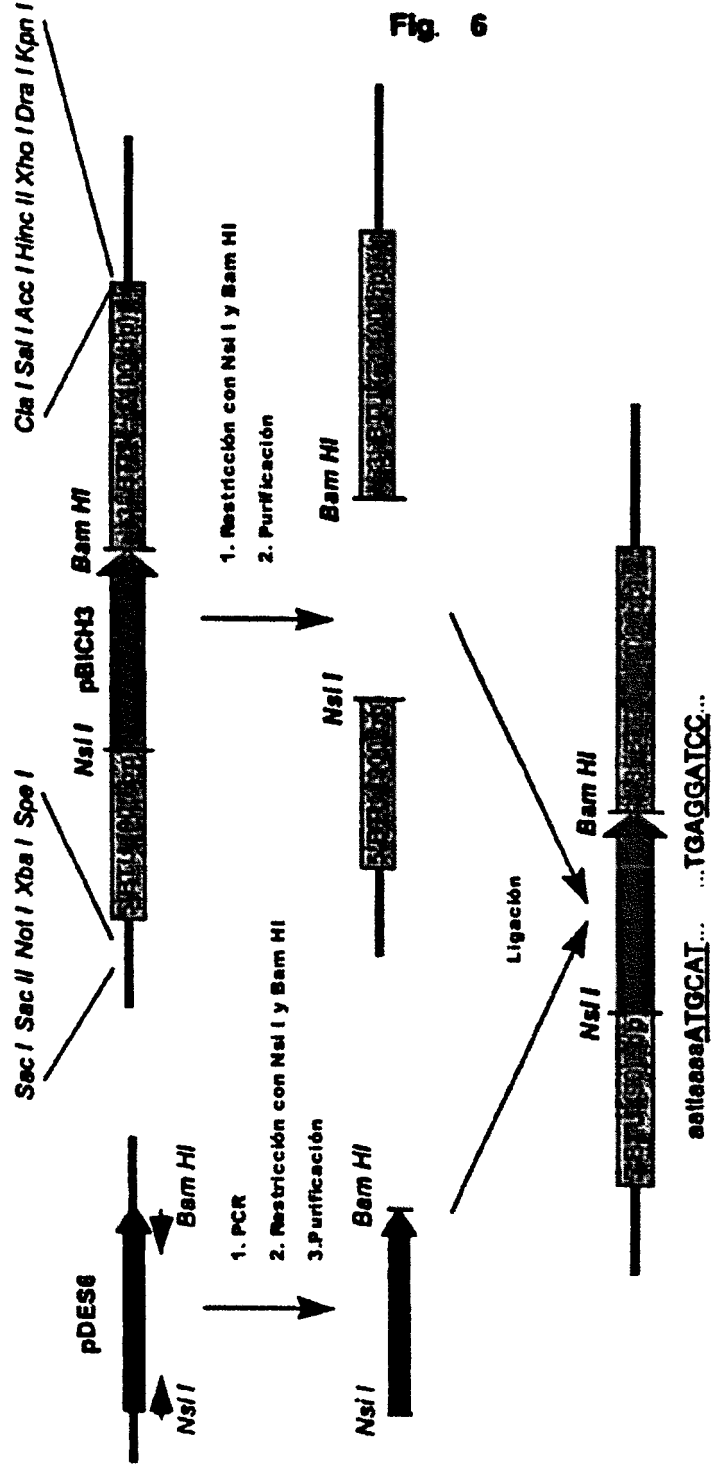


Fig. 6

Constructo de expresión de delta-6 desaturasa pBDes6

Fig. 7

CONSTRUCTO DE DESACTIVACIÓN DE DELTA-6 DESATURASA

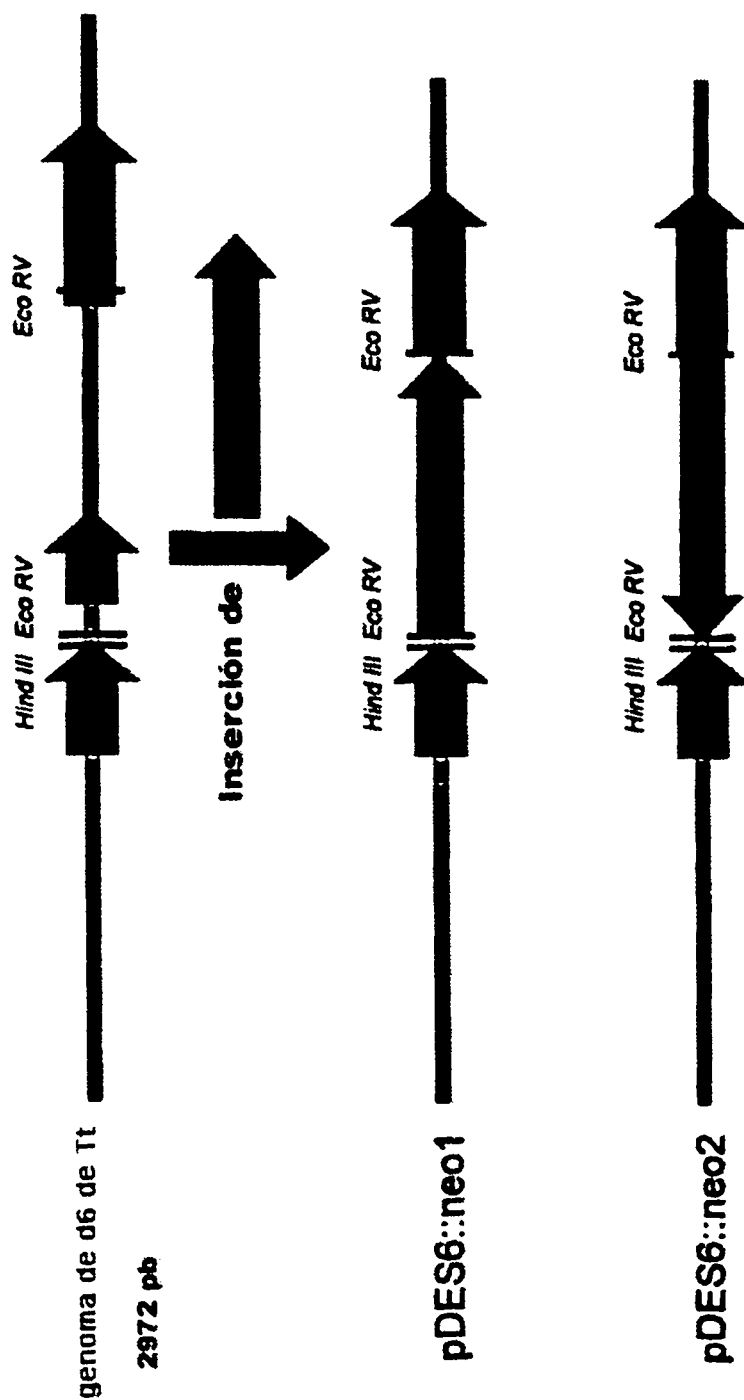
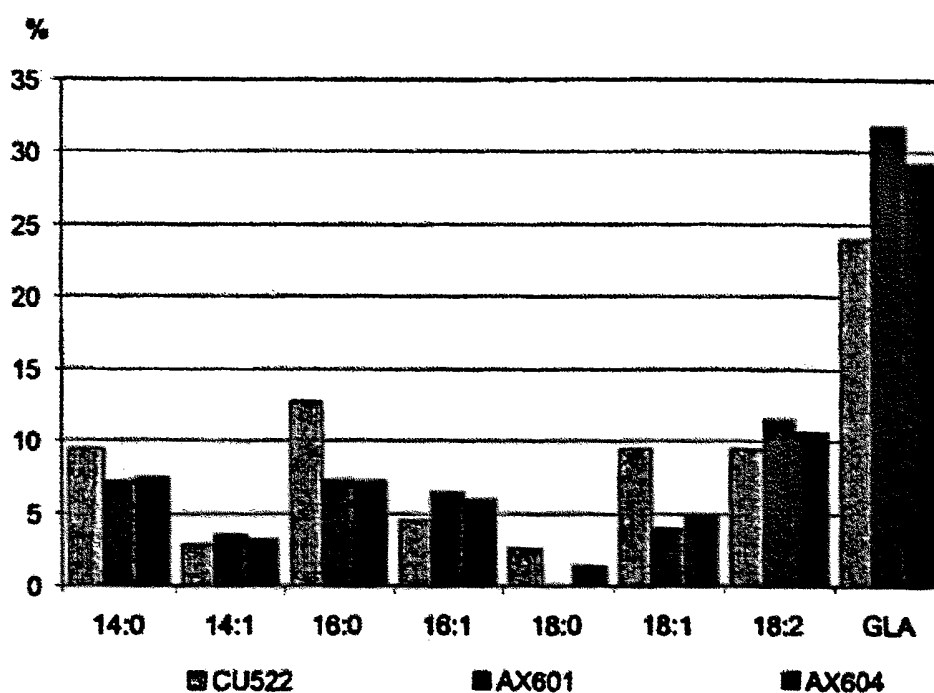


Fig. 8



Comparación del espectro de ácidos grasos (ácidos grasos principales) de los transformantes de pBDES6 de *Tetrahymena* (AX601 y AX604) en comparación con la cepa de tipo natural de *Tetrahymena* (CU522) después de 50 h de cultivo. Está indicada la proporción porcentual de los ácidos grasos principales en el espectro total de ácidos grasos

ES 2 299 433 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

5 <120> Nuevo ácido nucleico a partir de *Tetrahymena* que codifica para una delta-6 desaturasa, su producción y su uso

<130> ax99046wo

10 <140>

<141>

<150> DE 19943270.8

15 <151> 10-09-1999

<160> 19

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1219

25 <212> ADN

<213> *Tetrahymena thermophila*

<400> 1

30

```
agtaagcaaa ctaaatTTaa aaaacaagca ttatgggagt tgataagact taagaagaaa 60
ttgttcttga aaataaacCC gaacttctca acgaatacaa atttatttac aaggatactg 120
35 aatattgactg cactgaatat gctaaatcaa ataagcatcc tggcgggtctt aatttcctca 180
atttgTTTTat tgatgagaag taagatttga ctgaatatTT cagaacactc cattctaagt 240
aggctttgaa aatttttaaaa tccttcccta agactggcgc aaataagag gagactgaat 300
cttcaaagag attctcaata ttaaagaaaa agcttaagca tttattcga ccaaactggc 360
40 ctatcgaaat tggTTTTattc ttaactacct ttactttatt tgtcactgga tgtttgactc 420
aaaagtggta tttctctatt ccccttcttg tcttaatgca aatcatcagt ggttggattg 480
gtcactctat gaaccacaat cgtaacccta tattaagaaa attcgcTTta gtctacgctc 540
ctctttgtgg tggTTTTctct aataaatggt ggggtaggaa gcacaatcaa catcatatgt 600
45 tcacaacaaa cattctaang gacgaagata tctaacacga ttacaaattg tggaatttcc 660
ccttcttatt tttaaagtgg aaattagact ccatcttagc ttcttattat gaatttgaag 720
gaatcttctt tgccttgca c tgggtattat tattcaacta aaacttctat atcgtaattc 780
50 tttctgaatt gattgctggt ttcttcagtg cttctattct tgttggaaat catgaaatg 840
aatgaatt cgaagaaga atcactttac catttttcga acatcaata gctgcaagca 900
gaaactacgc tttccacgac atattctctc tacttattat ggggtggtatg taatattaga 960
ctgaacatca ctttttccca taaattcctt tctacagatt acccaaagct cgtgtcataa 1020
55 ttgctgaaga attaaagaag tggaacctta agattcatga aggacctatt tttgaaaaat 1080
ctcacctttg aaataaata aatttatttt aatgcatat tttattagta atactaacia 1140
ttgtaggaaa tgtgTTatgg tttgtttact tattactttt taatctgaga aaacagtctt 1200
60 aacaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1219
```

<210> 2

<211> 352

65 <212> PRT

<213> *Tetrahymena thermophila*

ES 2 299 433 T3

<400> 2

5 Met Gly Val Asp Lys Thr Gln Glu Glu Ile Val Leu Glu Asn Lys Pro
1 5 10 15

10 Glu Leu Leu Asn Glu Tyr Lys Phe Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Tyr Asp
20 25 30

15 Cys Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Asn Lys His Pro Gly Gly Leu Asn Phe
35 40 45

20 Leu Asn Leu Phe Ile Asp Glu Lys Gln Asp Leu Thr Glu Tyr Phe Arg
50 55 60

25 Thr Leu His Ser Lys Gln Ala Leu Lys Ile Leu Lys Ser Phe Pro Lys
65 70 75 80

30 Thr Gly Ala Lys Lys Gln Glu Glu Thr Glu Ser Ser Lys Arg Phe Ser Ile
85 90 95

35 Leu Lys Lys Lys Leu Lys His Leu Phe Glu Pro Asn Trp Pro Ile Glu
100 105 110

40 Ile Gly Leu Phe Leu Thr Thr Phe Thr Leu Phe Val Thr Gly Cys Leu
115 120 125

45 Thr Gln Lys Trp Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Met Gln Ile
130 135 140

50 Ile Ser Gly Trp Ile Gly His Ser Met Asn His Asn Arg Asn Pro Ile
145 150 155 160

55 Leu Arg Lys Phe Ala Leu Val Tyr Ala Pro Leu Cys Gly Gly Phe Ser
165 170 175

60 Asn Lys Trp Trp Gly Arg Lys His Asn Gln His His Met Phe Thr Asn
180 185 190

65 Asn Ile Leu Lys Asp Glu Asp Ile Gln His Asp Tyr Lys Leu Trp Gln
195 200 205

Phe Pro Phe Leu Phe Leu Lys Trp Lys Leu Asp Ser Ile Leu Ala Ser
210 215 220

ES 2 299 433 T3

Tyr Tyr Glu Phe Glu Gly Ile Phe Leu Ala Leu His Trp Val Leu Leu
 225 230 235 240

5

Phe Asn Gln Asn Phe Tyr Ile Val Ile Leu Ser Glu Leu Ile Ala Gly
 245 250 255

10

Phe Phe Ser Ala Ser Ile Leu Val Gly Asn His Glu Asn Glu Met Lys
 260 265 270

15

Phe Glu Arg Arg Ile Thr Leu Pro Phe Phe Glu His Gln Ile Ala Ala
 275 280 285

20

Ser Arg Asn Tyr Ala Phe His Asp Ile Phe Ser Leu Leu Ile Met Gly
 290 295 300

25

Gly Met Gln Tyr Gln Thr Glu His His Phe Phe Pro Gln Ile Pro Phe
 305 310 315 320

30

Tyr Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Ile Ile Ala Glu Glu Leu Lys Lys
 325 330 335

35

<210> 3

<211> 2492

<212> ADN

40

<213> *Tetrahymena thermophila*

<400> 3

45

taaaacgatt ataatatca cacaaattaa accgaaaaag agttaaagt ctaattattaa 60
 taatataatt tatctaaatt gaaagatggt tcaattaatt tgaattatt ttgaagcaaa 120
 ataattcgat tcgtgtaaga tggaaattga aagaattaag gtttagaaaa gttctttttg 180
 taaaataata gagttaaagt caataaattt tatattacgt aatctttaa gtgtgcaaat 240
 gttatcatta acaattctaa atgatgcaaa atatttaast tattaanaat aatgatagtt 300
 aatasaatca atatttcata ataataataa ggtatctatc tatctatcaa ttttcaata 360
 aatattaatt aaaagggttat aaaataagta agcaaaactaa atttaaaaa caagcattat 420
 gggagttgat aagacttaag aagaaattgt tcttgaaaat aaacccgaac ttctcaacga 480
 atacaatttt atttacaagg atactgaata tgactgcact gaatatgcta aatcaataa 540
 gcatcctggc ggtcttaatt tcctcaattt gtttattgat gagaagtaag atttgactga 600
 atatttcaga aactccatt ctaagtaggc tttgaaaatt ttaaatcct tccttaagac 660
 tggcgcaaaa taagaggaga ctgaatcttc aaagagattc tcaatattaa agaaaaagct 720
 taagcatgta aatacattca aatgatatct ttattgagca tatttagcat aatttgataa 780
 ttttcataag catattttaa attataaaaa tgaacatatt tttaattaa tttagttatt 840

65

ES 2 299 433 T3

5 cgaaccaaac tggcctatcg aaattgggtt attcttaact acctttactt tatttgtcac 900
 tggatgtttg actcaaaagt ggtattttctc tattcccctt cttgtcttaa tgcaaatcat 960
 cagtggttgg attggteact ctatgaacca caatcgtaac cctatatata gaaaattogc 1020
 tttagtctac gctcctcttt gtggtgggtt ctctaataaa tgggtgggta ggaagcacia 1080
 tcaagtaacc ataataatta atataaatat ataaagattt tttggttttg cgaggaaaaa 1140
 agtcatattt tgatgcttta atagtacaaa caatatattg ttggtatgat taaattatta 1200
 10 aagatcttaa tttagccttt tttaaaaatt tcaataaat ttgaagataa tattattaaa 1260
 gtataataaa tgattaagcc aaaatctgta ccaaaaatct gtaaatataa aatcaacttc 1320
 acacaaagat tacacatagc attttatttt ttataataaa ataatgaaa atagtttttt 1380
 attttaagaa atgaataaac tttttttccc tatgattttc aattaataaa aagcattgct 1440
 15 atacaaataa ttgaaaaaag ctaaactctt tttctattaa aattaattac aaattgtaa 1500
 agattaattt taccatttaa ttttaagtacc gcaataagca aatctctatt ttttttaagc 1560
 aatgacgtca cggataaata ttatcactact attcctcaat aataaatcat ctttaaaata 1620
 atttaaaact aattaatata attctaataa aagcatcata tgttcacaaa caacattcta 1680
 20 aaggacgaag atatctaaca cgattacaaa ttgtgtaat tccccttctt atttttaaag 1740
 tggaaattag actccatctt agcttcttat tatgaatttg aaggaatctt ccttgcttg 1800
 cactgggtat tattattcaa ctaaaacttc tatatcgtaa ttctttctga attgattgct 1860
 25 ggtttcttca gtgcttctat tcttgttgga aatcatgaaa atgaaatgaa attcgaaga 1920
 agaatcactt taccattttt cgaacatcaa atagctgcaa gcagaaacta cgctttccac 1980
 gacatattct ctctacttat tatgggtggt atgtaatatt agactgaaca tcactttttc 2040
 ccataaattc ctttctacag attaccctaaa gctcgtgca taattgctga agaattaaag 2100
 30 aagtgaacc ttaagattca tgaaggacct atttttgaaa aatctcacct ttgaaaataa 2160
 ataaatttat tttaaatgca tattttatta gtaatactaa caattgtagg aaatgtgta 2220
 tggtttggtt acttattact ttttaactcg agaaaacagt cttaacattt attcgatttt 2280
 35 atttaacatt acttttttaa aascaatttt gcttactata aatttacata agtatagtaa 2340
 gaaactaagt tgatgggtgt attttttaat ttttctaatt aatttgtgaa taacgatga 2400
 ttttaatttat taatccagca aataggcata attatattac aaataccagc ccgggcccgc 2460
 gaccacgcgt gccctatagt gagtcgtatt ac 2492

40

<210> 4

<211> 10

45 <212> PRT

<213> *Tetrahymena thermophila*

<400> 4

50

Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His
 1 5 10

55 <210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> *Tetrahymena thermophila*

60 <400> 5

Gly Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
 1 5 10

65 <210> 6

<211> 20

ES 2 299 433 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 6	
10	tggtggaart ggamncayaa	20
	<210> 7	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 7	
25	cgdggraana rrtgrtggtc	20
	<210> 8	
30	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 8	
40	gaccacgcgt atcgatgctg acttttttt ttttttttv	40
	<210> 9	
45	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 9	
55	ggaatcaca tcaacatcat atgttcac	28
	<210> 10	
60	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 433 T3

<400> 10		
	cttcgctcct tagaatgttg tttgtgaac	29
5	<210> 11	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 11	
	agtaagcaaa ctaaatttaa aaaacaagc	29
20	<210> 12	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 12	
	agtaagcaaa ctaaatttaa aaaacaagc	29
35	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 13	
	ggctcctcat gaatcttaag gtccacttc	30
50	<210> 14	
	<211> 27	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 14	
	cttaagtctt atcaactccc ataatgc	27
65	<210> 15	
	<211> 30	

ES 2 299 433 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
10	gaagtggaac ctaagattc atgaaggacc	30
	<210> 16	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 16	
25	gcattatgca tgttgataag acttaagaag	30
	<210> 17	
30	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 17	
40	tatggatcct caaaggtgag attttcaaa aatag	35
	<210> 18	
45	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 18	
55	aaaaataaaa aagtttgaag aaaaaccttc	30
	<210> 19	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 299 433 T3

<400> 19

gtttagctga ccgattcagt tc

22

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65