



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 275 365**

② Número de solicitud: 200301759

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.07.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2007**

Fecha de la concesión: **31.03.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

⑰ Titular/es: **Universidad de Córdoba
Rectorado Universidad de Córdoba
Alfonso XIII, 13
14001 Córdoba, ES**

⑱ Inventor/es: **Aguilar Urbano, Miguel;
Gálvez Valdivieso, Gregorio;
Maldonado Ruiz, José María;
Piedras Montilla, Pedro;
Vera Postigo, José Manuel y
Pineda Priego, Manuel**

⑲ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de Chlamydomonas y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de Chlamydomonas y sus aplicaciones.

Dicha molécula comprende (a) una secuencia de ADN identificada por SEQ ID No. 1, o (b) una secuencia de ADN análoga a la misma que (i) es sustancialmente homóloga a ella, y/o que (ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por dicha secuencia de ADN definida en (a).

Dicha molécula introducida en una planta productora de tocoferoles por técnicas habituales en biotecnología, permite aumentar el contenido de vitamina E total en dicha planta, así como el contenido en α y γ -tocoferol, entre otras aplicaciones, como aumentar la resistencia a ciertos herbicidas seleccionados del grupo formado por las tricetonas y los isoxazoles.

ES 2 275 365 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 275 365 B1

DESCRIPCIÓN

Molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de Chlamydomonas y sus aplicaciones.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más específicamente la invención se refiere a una molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de Chlamydomonas y al empleo de la misma tanto para modular la expresión de tocoferoles, como para obtener plantas transgénicas resistentes a ciertos herbicidas. La invención también se refiere al contenido de vitamina E total, γ - y α -tocoferol obtenido por represión, expresión y traducción de dicha molécula de ADN.

Estado de la técnica anterior a la invención

15 Los radicales libres son compuestos muy reactivos producidos en los organismos vivos en procesos normales como consecuencia del metabolismo del oxígeno. Unos niveles normales de radicales libres en nuestras células tienen cierto papel beneficioso en el organismo; en cambio, unos niveles elevados son perjudiciales para la salud. Los radicales libres pueden atacar a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y dañar así la estructura y funciones de las membranas celulares, también causan daños al ADN y a las proteínas. Los radicales libres conducen a un estrés oxidativo que está implicado en el desarrollo de una serie de enfermedades relacionadas con la edad como la debilitación cognitiva y la enfermedad de Alzheimer, la debilidad del sistema inmune, cataratas, arteriosclerosis, cáncer y artritis (Cross, 1987). Existen numerosos factores ambientales que pueden inducir una elevada producción de radicales libres; entre estos se encuentran las radiaciones, los humos y los pesticidas (Jacobson, 1987; Halliwell, 1996) (los datos completos de éstas y las demás citas bibliográficas se dan al final de la descripción para no hacer demasiado farragosa la presente exposición).

Los seres vivos presentan varios mecanismos con función antioxidante. Entre las diversas sustancias con capacidad antioxidante se encuentra la vitamina E. Su papel como atrapador de radicales libres es crucial en la prevención de la oxidación de los ácidos grasos insaturados situados en la membrana plasmática y es considerada la primera línea de defensa contra la peroxidación de lípidos (Horwitt, 1986; Packer *et al.*, 1995, Halliwell, 1996).

La vitamina E es sintetizada sólo por las plantas; por tanto se encuentra fundamentalmente en productos vegetales (aceites vegetales, semillas ...). Existen 4 tocoferoles con actividad vitamina E (α , β , γ y δ -tocoferol). Todas las plantas superiores tienen α -tocoferol (hojas y otras partes verdes), mientras que el γ -tocoferol (también el β - y el δ -tocoferol) está presente en concentraciones muy inferiores (Combs, 1992). Las proporciones individuales de los tocoferoles varían ampliamente entre los diferentes aceites de semillas.

La vitamina E se distribuye por todos los tejidos del cuerpo humano a través del plasma y elementos celulares de la sangre, como eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Bajo ciertas circunstancias la vitamina E es transportada por la linfa y la sangre como tocoferol libre o unido a β -lipoproteína (Bjoerneboe, 1990). La forma predominante en plasma humano es α -tocoferol, que constituye el 90% de la concentración total de vitamina E, y el resto está formado por γ -tocoferol y β -tocoferol en una proporción de 5:1. De δ -tocoferol y tocotrienoles se encuentran sólo trazas en plasma humano.

La mayor parte de la vitamina E procede de la toma diaria de aceites y margarina. La absorción de la vitamina E depende de la habilidad del cuerpo para absorber grasas; por tanto, alguna enfermedad que afecte a la digestión, absorción o transporte de estas grasas puede conducir a deficiencias en vitamina E. Una deficiencia severa y crónica puede dar lugar a un característico síndrome neurológico de neuropatía progresiva, con ausencia o disminución de reflejos, debilidad de los miembros, alteración en la marcha y pérdida sensorial en brazos y piernas. En los roedores, el déficit de vitamina E produce esterilidad, parálisis y distrofia muscular (Sokol, 1988). El exceso en el consumo de vitamina E no parece producir efectos nocivos.

Estudios recientes que comparan la vitamina E natural con la forma sintética sugieren que la biodisponibilidad de la forma natural es dos veces superior a la de la vitamina E sintética. La vitamina E natural y la sintética muestran las siguientes diferencias (Horwitt, 1986; Cheng *et al.*, 1987; Ingold *et al.*, 1987):

1.- La vitamina E natural es derivada de aceites vegetales, principalmente de aceite de soja, mientras que la vitamina E sintética se produce a partir de derivados del petróleo.

2.- La vitamina E natural es un estereoisómero, por el contrario la vitamina E sintética es una mezcla de ocho estereoisómeros.

3.- La vitamina E natural es más biodisponible que la forma sintética.

65 4.- La vitamina E natural queda retenida durante más tiempo en tejidos del cuerpo que la forma sintética.

En la actualidad existe un gran interés hacia el uso de antioxidantes en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosmética (Combs, 1992; Halliwell *et al.*, 1992). Esto produce una gran demanda de antioxidantes estables, a lo

ES 2 275 365 B1

que hay que añadir la preferencia por parte de los consumidores y de las autoridades sanitarias por los de carácter natural, básicamente vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), y extractos relativamente complejos de varias especies de plantas (*Rosmarinus officinalis*, *Nerium oleander* y *Myrtus communis*).

5 Los trabajos de Chipault y colaboradores (Chipault *et al.*, 1952, 1955, 1956) fueron los precursores de muchos estudios sobre la capacidad antioxidante de un número de extractos de plantas con aplicaciones potenciales como conservantes en industrias alimentarias, farmacéuticas y de cosmética (Taga *et al.*, 1984; Written *et al.*, 1984; Wu *et al.*, 1984; Economou *et al.*, 1991; Mallet *et al.*, 1994; Daoood *et al.*, 1996; Schwants *et al.*, 1996).

10 El alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* es un organismo modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos y genético-moleculares. Su tiempo de generación relativamente corto (6 horas) permite un rápido crecimiento y una fácil disponibilidad de material celular, lo que unido a la existencia de técnicas sencillas y eficientes que permiten la transformación tanto de genes nucleares como cloroplásticos, la convierte en un candidato idóneo para la producción y posterior extracción de tocoferoles.

15 La p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (EC 1.13.11.27) es la enzima que cataliza la transformación del p-hidroxifenilpiruvato en ácido homogentísico, que es el primer compuesto de las rutas de síntesis de plastoquinonas y tocoferoles.

20 Una alternativa para obtener algas con mayor capacidad antioxidante sería el desarrollo de estirpes transgénicas que tuvieran unos niveles elevados de ARNm correspondientes a la p-HPPD con el fin de aumentar los niveles totales de tocoferol mediante la sobreexpresión del gen de la p-HPPD, habida cuenta de los resultados mostrados por Shintani y DellaPenna (1998), en los que los niveles totales de vitamina E no se incrementan en transformantes antisentido carentes de actividad γ -tocoferol metiltransferasa, y en los que sólo se ve afectada la proporción relativa de los distintos isómeros del tocoferol. Para ello, es necesario identificar, aislar y caracterizar el ADN genómico (ADNg) o complementario (ADNc), que codifica la p-HPPD de *Chlamydomonas* y/o el ARNm correspondiente a dicha enzima. Igualmente, la obtención de organismos caracterizados por una alta producción de γ -tocoferol puede plantearse mediante estrategias antisentido que permitan disminuir la expresión del gen de la γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT).

30 La p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD, EC 1.13.11.27, EC 1.14.2.2) es un sitio diana para algunos herbicidas (Schulz *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997, 1998; Pallet *et al.*, 1998; Viviani *et al.*, 1998). Los inhibidores de esta enzima interrumpen la biosíntesis de carotenoides y tiene como resultado un blanqueamiento de la hoja debido a la pérdida de clorofila. Aunque estos síntomas son similares a los observados en plantas tratadas con inhibidores de la fitoeno desaturasa (Lee *et al.*, 1997), la inhibición de la HPPD tiene un mecanismo de acción diferente. La inhibición de la HPPD afecta indirectamente a la actividad fitoeno desaturasa reduciendo el pool de plastoquinonas disponibles (Pallet *et al.*, 1998). El subsiguiente descenso de los niveles de carotenoides causa el blanqueamiento foliar, ya que el aparato fotosintético deja de ser estabilizado por esos pigmentos. En condiciones de alta intensidad lumínica, no se captura el exceso de energía y se destruyen las moléculas de clorofila.

40 Los inhibidores de la HPPD han permitido desarrollar una nueva clase de herbicidas basados en el esqueleto de la tricetona que aparentemente imita un intermedio de la reacción. Estos compuestos son inhibidores dependientes del tiempo de esta enzima. La sulcotriona (2-[cloro-4-metanosulfonilbenzoni]ciclohexano)-1,3-diona y el isoxaflutol (5-cilopropil-4-(4-trifluorometil-2-metanosulfonilbenzoni)isoxazol) son productos comerciales pertenecientes a dos de esas clases. La sulcotriona posee la clásica estructura requerida para un inhibidor de la HPPD, mientras que el isoxaflutol debe de ser activado a la forma conjugada dicetonitrilo después de la apertura del anillo isoxazol (Viviani *et al.*, 1998). Estos son potentes herbicidas utilizados en el control pre- y post-emergente de malas hierbas en maíz.

50 La invención proporciona una solución a la necesidad existente de conseguir la clonación de un gen de *Chlamydomonas*, así como el correspondiente ADNc, que codifica para una HPPD de *Chlamydomonas*.

Compendio de la invención

55 El principal objeto de esta invención lo constituye una molécula de ADN que codifica una HPPD de *Chlamydomonas*.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN para modular la expresión de la HPPD en *Chlamydomonas*.

60 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de ADN que comprende la totalidad o una parte de dicha molécula de ADN, así como un vector que contiene dicha molécula o construcción de ADN y una célula transformada con dicho vector.

65 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN, o de dicha construcción de ADN, en la obtención de algas transgénicas que expresan una actividad enzimática HPPD modulada. Las algas transgénicas resultantes constituyen otro objeto adicional de esta invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) de Chlamydomonas, en adelante molécula de ADN de la invención, seleccionada entre:

- a) una secuencia de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID No 1.
- b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
 - i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a) y/o, que
 - ii) codifica un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo/a” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que codifica para una enzima que posee, al menos, actividad HPPD que tiene las propiedades i)-ii) arriba mencionadas. Típicamente la secuencia de ADN análoga:

- se puede aislar de otra especie que produce una HPPD en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1, o

- se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas, es decir, que dan lugar a la misma secuencia de aminoácidos de la HPPD que la codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1, pero que corresponde al empleo de codones del organismo hospedador destinado a la producción de la proteína, o bien mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que dan lugar a una secuencia de aminoácidos diferente y, por tanto, posiblemente a una estructura proteica diferente que pudiera dar lugar a una proteína mutante con propiedades diferentes a las de la proteína nativa. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ADN análogo puede ser una sub-secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID No 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga”, aplicada a secuencias de nucleótidos, significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos un 70%, preferentemente de al menos un 85%, o más preferentemente de al menos un 95%.

La molécula de ADN de la invención puede proceder de cualquier estirpe de Chlamydomonas o bien de un organismo hospedador transformado con dicha molécula de ADN.

Alternativamente, la molécula de ADN de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir de ADN de cualquier otra especie mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de ADN proporcionada en esta descripción.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADNc del ARNm correspondiente al gen de la HPPD de Chlamydomonas, relacionado con la biosíntesis de los tocoferoles y plastoquinonas, que se ha caracterizado molecular y fisiológicamente y cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1. El análisis comparativo de la secuencia deducida de la proteína ha puesto de manifiesto que este gen corresponde a un gen que codifica una HPPD. La SEQ ID No 1 corresponde a la secuencia completa del ADNc del ARNm de la HPPD de Chlamydomonas.

La molécula de ADN de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, mediante un procedimiento que comprende la extracción del ARNm correspondiente a la transcripción del gen que codifica la HPPD a partir de un organismo productor de dicha enzima, la obtención de una primera cadena de ADNc por transcripción inversa del correspondiente ARNm, la síntesis de una segunda cadena de ADNc, complementaria a la primera, para obtener un ADNc de doble cadena, la unión de unos adaptadores para su inserción en plásmidos o fagos para su propagación en, por ejemplo, un sistema bacteriano y la identificación de los clones que portan el ADNc deseado.

En una realización particular (véase el Ejemplo 1), se ha caracterizado una EST de Chlamydomonas, a partir de la cual se han diseñado oligonucleótidos específicos (SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4) que han permitido obtener un clon casi completo de ADNc correspondiente al ARNm de la HPPD de Chlamydomonas mediante un procedimiento que comprende aplicar la técnica RT-PCR (Retrotranscriptase-PCR) a ARNm procedentes de algas cultivadas en medio autotrófico (Harris, 1989) a 25°C con iluminación continua de 15-20 W/m² proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca y burbujeadas con aire enriquecido con CO₂ (5% V/V). Para ello, se extrajeron los ARNm de dichas células, se sometieron a una reacción de transcripción inversa (RT) para obtener los correspondientes ADNc de cadena simple y se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos específicos previamente diseñados. Los productos de la amplificación se subclonaron en unos vectores apropiados que se utilizaron para transformar bacterias: seguidamente se extrajo el

ES 2 275 365 B1

ADN correspondiente al plásmido recombinante, que se purificó y secuenció. La secuencia obtenida (SEQ ID No 1) se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos utilizando el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). La comparación de las secuencias puso de manifiesto que la secuencia de ADN obtenida presentaba una relativamente elevada homología de secuencia única y exclusivamente con otras secuencias de organismos que codifican una p-HPPD.

La invención proporciona, además, una construcción de ADN, en adelante, construcción de ADN de la invención, que comprende la totalidad de la molécula de ADN de la invención o un fragmento de, al menos, 8 nucleótidos consecutivos de la molécula de ADN de la invención y una región iniciadora de la transcripción funcional en plantas. En dicha construcción, cualquiera de los extremos (3' ó 5') de la totalidad o del fragmento de la molécula de ADN de la invención puede estar unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción. La construcción de ADN de la invención también puede contener, operativamente enlazada, una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización particular, dicha región iniciadora y terminadora de la transcripción sería funcional en células de *Chlamydomonas*.

La molécula de ADN de la invención, o la construcción de ADN de la invención, puede ser insertada en un vector apropiado; por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha molécula de ADN, o una construcción que la contiene. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el (o en los que) se ha integrado.

En el vector proporcionado por esta invención, la molécula de ADN de la invención estará conectada operativamente a un promotor y a una secuencia terminadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora elegida y puede derivar bien de genes que codifican para proteínas homólogas o heterólogas de la célula hospedadora. Los procedimientos utilizados para ligar la secuencia de ADN de la invención al promotor y a la secuencia terminadora, respectivamente, y para insertar dicha construcción en un vector son bien conocidos por los técnicos en la materia y han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989).

La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ADN de la invención, o una construcción de ADN que contiene a dicha secuencia o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de ADN de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc., véase, por ejemplo, el libro titulado "Gene Transfer to Plants", de I. Potrykus y G. Spangenberg. Ed. Springer Lab. Manual (1995).

La invención también proporciona una proteína con actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, en adelante HPPD de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No 2;
- b) la secuencia de aminoácidos deducidos a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No 1; y
- c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente definidas en a) o en b).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos un 70%, preferentemente de al menos un 85%, y, más preferentemente de al menos un 95%.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que la proteína en cuestión tiene una actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa.

En una realización particular, la HPPD de la invención es una HPPD de *Chlamydomonas* (*Chlamydomonas reinhardtii*) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 2. La SEQ ID No 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un fragmento de una HPPD de *Chlamydomonas* y ha sido deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del fragmento parcial del ADNc del ARNm correspondiente al gen de la HPPD de *Chlamydomonas* mostrada en la SEQ ID No. 1. La comparación entre la SEQ ID No. 1 y las secuencias presentes en las bases de datos puso de manifiesto una identidad de secuencia a nivel de aminoácidos significativa con secuencias correspondientes a HPPD de plantas superiores. El análisis por ordenador del ORF del gen HPPD mostró una proteína deducida de 432 aminoácidos.

La HPPD de la invención puede obtenerse mediante un método que implica cultivar una célula hospedadora adecuada que contiene la molécula de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención, bajo condiciones que permiten la producción de la proteína y su recuperación del medio de cultivo.

ES 2 275 365 B1

La HPPD de la invención puede obtenerse, alternativamente, a partir de un organismo productor de la misma mediante un procedimiento que comprende el cultivo del organismo productor, en las condiciones apropiadas para la expresión de dicha enzima, y, posteriormente, recuperar dicha enzima.

5 La HPPD de la invención tiene importancia en la industria alimentaria, en particular, en la industria del procesado y de la conservación de alimentos, tales como atún, sardinas, etc. El empleo de la HPPD de la invención en la industria alimentaria podría dar lugar a alimentos con unos niveles superiores de antioxidantes naturales otorgando así un valor añadido a dichos productos alimenticios puesto que se podría aumentar el tiempo de conservación de los mismos. La molécula de ADN de la invención puede ser utilizada en procesos de mejora de la conservación de diferentes alimentos, 10 modulando la expresión por sobreexpresión de la HPPD, alterando con ello por un lado la mayor capacidad vitamínica de los alimentos y por otro la resistencia al deterioro de dichos alimentos. Por otro lado, la HPPD de la invención también podría utilizarse en la industria agronómica. Su uso podría dar lugar a plantas que presentasen tolerancia a ciertos herbicidas como los de la familia de los isoxazoles o de las tricetonas. En una realización particular, la molécula de ADN de la invención se utiliza en la obtención de plantas transgénicas que poseen unos niveles de ARNm correspondientes muy elevados o muy reducidos o inexistentes. Para la obtención de estas plantas transgénicas se 15 puede proceder con las técnicas convencionales de ARNm antisentido y/o sobreexpresión (silenciamiento en sentido), u otras.

Por tanto, la invención también se refiere a una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de 20 ADN de la invención que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN de la invención, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

Una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas, constituye un objeto adicional de esta invención. En una realización particular, las plantas transgénicas son plantas que producen diferentes niveles tanto de γ -tocoferol como de α -tocoferol. En otra realización particular las plantas transgénicas son plantas con distinto grado de tolerancia a ciertos herbicidas.

La utilización de la molécula de ADN de la invención, en particular, de una molécula de ADNc que codifica 30 una HPPD de Chlamydomonas, de longitud completa o parcial, mediante cualquier tipo de técnica, puede generar células transgénicas que tengan alterados los niveles de tocoferoles o de vitamina E total, lo que redundaría en un valor económico añadido a las mismas.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye una preparación enzimática resultante de la ruptura 35 de la célula u organismo hospedador que contiene la molécula o construcción de ADN de la invención, así como al resultante de someter a esta preparación a diversos pasos de purificación o enriquecimiento por los métodos conocidos por los técnicos en la materia. Una preparación resultante de mezclar la preparación anterior con otros componentes también es objeto de la invención.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye un método basado en la sobreexpresión del gen que 40 codifica la HPPD mediante los métodos conocidos por los técnicos en la materia, que permita el aumento en el contenido de vitamina E, o de cualquiera de los isómeros en particular.

Por último, otro objeto de la invención comprende un método basado en cualquiera de las técnicas conocidas 45 que permita la sobreexpresión del gen que codifica la HPPD y así conferir resistencia a los herbicidas que actúan inhibiéndola, lo que permite además su utilización como gen marcador en procesos de transformación.

Modos de realización de la invención

50 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben ser considerados como limitadores del alcance de la misma.

Ejemplo 1

55 Clonaje del gen *hppd1*

Se ha clonado el gen *hppd1*, que codifica una p-HPPD de Chlamydomonas, relacionado con la biosíntesis de la vitamina E y plastoquinonas y se ha caracterizado molecular y fisiológicamente. El análisis comparativo de la 60 secuencia deducida de la proteína ha puesto de manifiesto que este gen corresponde a un gen que codifica una p-HPPD.

Para obtener el gen *hppd1* se siguió una estrategia que comprendía el empleo de la técnica RT-PCR, amplificando por PCR los fragmentos de ADNc obtenidos a partir de ARNm de células de Chlamydomonas cultivadas en medio 65 autotrófico (Harris, 1989) a 25°C con iluminación continua de 15-20 W/m² proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca y burbujeadas con aire enriquecido con CO₂ (5% v/v). Los productos amplificados se subclonaron en unos vectores y con dichos vectores se transformaron células de *Escherichia coli*, seleccionándose las células transformantes que contenían el vector con el inserto de ADNc correspondiente a la p-HPPD de Chlamydomonas, que

ES 2 275 365 B1

se aisló, purificó y secuenció. La secuencia obtenida se comparó con otras secuencias de ADN que codifican p-HPPD de otros organismos.

Seguidamente se explica con detalle este proceso:

1.1 Aislamiento de ARN

Para la obtención del ARNm correspondiente a la transcripción del gen que codifica la p-HPPD de *Chlamydomonas* se extrajo el ARN total procedente de células de *Chlamydomonas* cultivadas en medio autotrófico (Harris, 1989) a 25°C con iluminación continua de 15-20 W/m² proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca y burbujeadas con aire enriquecido con CO₂ (5% v/v). Para la extracción del ARN total se siguió una modificación del método descrito por Newman *et al.* (1990).

1.2 RT-PCR

Una vez extraído el ARN total se sometió a una reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Para ello se utilizó el kit comercial PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech, CA, Palo Alto). Las condiciones de la RT-PCR incluyen: síntesis de las subpoblaciones ancladas de ADNc de simple cadena, amplificación de las mismas por PCR utilizando iniciadores arbitrarios; separación y comparación de las poblaciones resultantes de ADNc de doble cadena mediante electroforesis en geles de agarosa; recuperación, desde el gel, de los fragmentos de ADNc amplificados; las condiciones fueron las que se indican en el manual de uso del citado kit "PowerScript Reverse Transcriptase"

A partir de la secuencia de una EST de *Chlamydomonas*, se sintetizaron dos oligonucleótidos específicos, SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 4, que se utilizaron para la reconstrucción mediante PCR del ADNc casi completo correspondiente al gen de la p-HPPD de *Chlamydomonas*.

Una vez amplificados por PCR los fragmentos de ADNc, éstos se purificaron de la mezcla de PCR mediante el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" de la casa comercial ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, siguiendo la metodología descrita en su manual de instrucciones.

Posteriormente, los productos de la amplificación, que se correspondían con los ARNm que contenían la secuencia de nucleótidos que codifica la p-HPPD de *Chlamydomonas*, se subclonaron en un vector pBluescript II KS⁺ de la casa comercial STRATAGENE siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de ADNc contenidos en el plásmido recombinante se secuenciaron en un secuenciador automático ABI 310 utilizando el kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing de APPLIED BIOSYSTEMS (California, Estados Unidos), y así se obtuvo la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1 (que corresponde a la secuencia de ADN que codifica para una HPPD de *Chlamydomonas*).

A continuación, se transformaron células de *E. coli* con dicho vector, y se comprobó que las células transformantes contenían el vector con el inserto de ADNc correspondiente a la p-HPPD de *Chlamydomonas* mediante técnicas convencionales descritas en Sambrook *et al.*, (1989). Seguidamente se extrajo el ADN correspondiente al plásmido recombinante, se purificó y secuenció utilizando un secuenciador automático de ADN mediante técnicas convencionales descritas en Sambrook *et al.* (1989). La secuencia obtenida (SEQ ID No 1) se comparó con las secuencias depositadas en las bases de datos utilizando el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). La comparación de las secuencias puso de manifiesto que la secuencia de ADN obtenida que codifica para la HPPD de *Chlamydomonas* presentaba una relativamente alta homología de secuencia única y exclusivamente con otras secuencias de diferentes organismos que codifican una HPPD.

De acuerdo con lo anterior, se ha conseguido clonar mediante RT-PCR el ADNc que codifica la p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa. Esto permitió la reconstrucción de un ADNc de 1838 pb que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD). La fase abierta de lectura desde el codón de inicio al codón de terminación codifica un péptido de 432 aminoácidos con una masa molecular calculada de 47206 Da, un punto isoelectrico de 5,50 y una carga neta de -10,331 a pH 7,0.

La clonación y caracterización del gen de la p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa constituye un paso previo para la obtención de organismos transgénicos con los niveles de tocoferoles alterados.

Por otro lado, el gen de la HPPD gen puede ser utilizado como un gen marcador en procesos de transformación de plantas, ya que confiere resistencia a ciertos herbicidas, o ser utilizado para crear plantas resistentes a dichos herbicidas.

Seguidamente, se proporciona una relación detallada de las referencias bibliográficas que se han ido citando a lo largo de la exposición anterior:

- **Bjorneboe, A., Bjoernboe, G., Drevon, C.** (1990). Absortion, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.* 120, 233-242.

ES 2 275 365 B1

- **Cheng, S.C., Burton, G.W., Ingold, K.U., Foster, D.O.** (1987). Chiral discrimination in the exchange of alpha-tocopherol stereoisomers between plasma and red blood cells. *Lipids* 22, 469-473.
- 5 - **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., Lundsberg, W.O.** (1952). Antioxidant properties of natural spices. *Food. Res.* 17, 46-55.
- **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., Lundsberg, W.O.** (1955). Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. *Food Res.* 20, 443-448.
- 10 - **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., Lundsberg, W.O.** (1956). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol.* 10, 209-211.
- **Combs, G.F.** (1992). The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press, San Diego.
- 15 - **Cross, C.E.** (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107, 526-545.
- **Daood, H.G., Winkler, M., Markus, F., Hebshi, E.A., Biacs, P.A.** (1996). Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chem.* 55-365-372.
- 20 - **Economou, K.D., Oreopoulou, V., Thomolopoulos, C.D.** (1991). Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiateaea. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 68, 109-113.
- **González, M.J.** (1990). Serum concentrations and cellular uptake of vitamin E. *Med. Hypotheses* 32, 107-110.
- 25 - **Halliwell, B.** (1996). Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.** (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* 6, 598-620.
- 30 - **Harris, E.** (1989). *The Chlamydomonas sourcebook.* (Harris E., ed) Academic Press, New York.
- **Horwitt, M.K.** (1986). The promotion of vitamin E. *J. Nutr.* 116, 1371-1377.
- **Horwitt, M.K.** (1986). Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B6. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 973-985.
- 35 - **Ingold, K.U., Burton, G.W., Foster, D.O., Hughes, L., Lindsay, D.A., Webb, A.** (1987). Biokinetics of and discrimination between dietary RRR- and SRR-alpha-tocopherols in the male. *Rat Lipids* 22, 163-172.
- 40 - **Jacobson, H.N.** (1987). Dietary standards and future developments. *Free Rad. Bici. Med.* 3, 209-213.
- **Lee, D.L., Prisbylla, M.P., Cromartie, T.H., Dagarin, D.P., Howard, S.W., Provan, W.M., Ellis, M.K., Fraser, T., Mutter, L.C.** (1997) The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Sci* 45, 601-609.
- 45 - **Lee, D.L., Knudsen, C.G., Michaely, W.J., Chin, H.L., Nguyen, N.H., Carter, C.G., Cromartie, T.H., Lake, B.H., Shribbs, J.M., Fraser, T.** (1998). The structure-activity relationships of the triketona class of HPPD herbicides. *Pestic. Sci.* 54, 377-384.
- 50 - **Mallet, J.F., Cerrati, C., Ucciani, E., Gamisans, J., Gruber, M.** (1994). Antioxidant activity of plant leaves in relation to their alpha-tocopherol content. *Food Chem.* 49, 61-65.
- **Newman, S.M., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Randolph-Anderson, B.L., Johnson, A.M., Harris, E.H.** Transformation of Chloroplast Ribosomal RNA Genes in Chlamydomonas: Molecular and Genetic Characterization of Integration Events. *Genetics* 1990 126: 875-888.
- 55 - **Parker, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J.** (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 227-250.
- 60 - **Pallett, K.E., Little, J.P., Sheekey, M., Veerasekaran, P.** (1998). The mode of action of isoxaflutole I. Physiological effects, metabolism, and selectivity. *Pestic. Biochem. And Physiol.* 62, 113-124.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, R.** (1998) Molecular cloning; A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.*
- 65 - **Schulz, A., Ort, O., Beyer, P., Kleinig, H.** (1993). SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione beaching herbicide is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* 318, 162-166.

ES 2 275 365 B1

- **Schwants, P., Kimball, B.A., Idso, S.B., Hendrix, D.L., Polle, A. (1996)** Antioxidants in sun and shade leaves of sour orange trees (*Citrus aurantium*) after long-term acclimation to elevated CO₂. *J. Exp. Bot.* 47, 1941-1950.

5 - **Shintani, D., DellaPenna, D. (1998)**. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*. 11, 2098-2100.

- **Sokol, R.J. (1988)**. Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.* 8, 351-373.

10 - **Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E. (1984)**. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 928-933.

15 - **Viviani, E., Little, J.P., Pallett, K.E. (1998)**. The mode of action of isoxaflutole II. Characterization of the inhibition of carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxigenase by the diketone nitrile derivative of isoxaflutole. *Pestic. Biochem. And Physiol.* 62, 125-134.

- **Written, C., Miller, E.E., Pratt, D.E. (1984)**. Cotton-seed flavonoids as lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1075-1078.

20 - **Wu, J.W., Lee, M.H., Ho, T., Chang, S.S. (1984)**. Elucidation of the chemical structure of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 339-345.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 275 365 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) de Chiamydomonas que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
- a) una secuencia de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID No. 1;
 - b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
 - 10 i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a) y/o, que
 - ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).
- 15 2. Molécula de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho ADN es ADNc.
3. Molécula de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho ADN es ADN genómico (ADNg).
- 20 4. Una construcción de ADN que comprende (i) una secuencia de ADN seleccionada entre una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un fragmento de, al menos, 8 nucleótidos consecutivos de dicha molécula de ADN, y (ii) una región iniciadora de la transcripción funcional de plantas.
- 25 5. Construcción de ADN según la reivindicación 4, en la que el extremo 3' de dicha secuencia de ADN está unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción.
6. Construcción de ADN según la reivindicación 4, en la que el extremo 5' de dicha secuencia de ADN está unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción.
- 30 7. Construcción de ADN según las reivindicaciones 4 a 6, que comprende, además, una secuencia de terminación de la transcripción.
8. Un vector recombinante que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
- 35 9. Una célula que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o un vector según la reivindicación 8.
- 40 10. Una proteína con actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, obtenible por expresión de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. Una proteína con actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- 45 a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 2,
 - b) la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1, y
 - 50 c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos definidas en a) o en b).
12. Un método para la producción de una proteína con actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 9 bajo condiciones que permitan la producción de dicha proteína con actividad p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa y recuperarla del medio de cultivo.
- 55 13. Una preparación enzimática, que comprende el producto resultante de la ruptura de la célula según la reivindicación 9, que contiene la molécula o construcción de ADN según las reivindicaciones 4 a 7, o el correspondiente producto purificado o enriquecido por métodos convencionales.
- 60 14. Una preparación enzimática según la reivindicación 13 que comprende, al menos, una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.
- 65 15. Preparación enzimática según la reivindicación 14, que comprende entre 0,01% y 100% en peso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.

ES 2 275 365 B1

16. Preparación enzimática según la reivindicación 15, que comprende, además una o más proteínas con actividades enzimáticas diferentes.

5 17. Un método para aumentar el contenido de vitamina E, o de cualquiera de sus isómeros en una planta productora de los mismos, que comprende la sobreexpresión del gen que codifica la HPPD.

18. Un método según la reivindicación 17, para aumentar el contenido de vitamina E total, que comprende introducir en una planta productora de tocoferoles una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de la molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

19. Un método según la reivindicación 17, para aumentar el contenido de la vitamina E total, que comprende introducir en una célula de una planta productora de tocoferoles una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

20. Un método según la reivindicación 17, para aumentar el contenido de α - y γ -tocoferol que comprende introducir en una célula de una planta productora de dichos tocoferoles una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

25 21. Una célula transgénica de una planta productora de tocoferoles que comprende una construcción de ADN que tiene un promotor funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

30 22. Una célula transgénica que comprende una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

35 23. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según las reivindicaciones 19 y 20.

24. Un método para aumentar la resistencia a herbicidas de determinadas plantas productoras de tocoferoles, que comprende la sobreexpresión del gen que codifica la HPPD.

40 25. Un método según la reivindicación 24, para aumentar la resistencia a ciertos herbicidas, de una planta productora de tocoferoles, que comprende introducir en dicha planta una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

45 26. Un método según la reivindicación 24, para aumentar la resistencia a ciertos herbicidas de una planta productora de tocoferoles, que comprende introducir en una célula de dicha planta una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

50 27. Un método según la reivindicación 24, para aumentar la resistencia a ciertos herbicidas de una planta productora de tocoferoles, que comprende introducir en una célula de dicha planta una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha célula, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

55 28. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que dichos herbicidas están seleccionados del grupo formado por las tricetonas y los isoxazoles.

60

65

ES 2 275 365 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Córdoba

5 <120> Molécula de ADN que codifica una p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de chlamydomonas y sus aplicaciones

<130> Patente de UCO (chlamydomonas)

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1838
<212> ADN
<213> Chlamydomonas

25 <400> 1

cacgaggcaa catcagecgt agcgccgttc gccgtgtctc cagaaccag aaggccttgt 60
30 gactggtcac gctcgcgcga cacgacttac cgctccattt atagcccata ccaactatgg 120
gagcgggtgg tgcaggcacc ggagatcggg aggggggcat taagctcgtg ggctacaaga 180
atctcgtgcg ccagaaccgc ctttcagaca aattcaccgt ccacaagttt catcacatcg 240
atctctggtg cggagatgca acaaacacat cgaagcggtt ctctacggc ctgggcatgc 300
35 cgctggtcgc caagtccgac cagtccacca acaaccagct ctttgctcc tacgtgctgc 360
gctccaacga cctggtcttc acctcaccg cgccctacag ccgcaagtgc gctcgggtca 420
gcgagggcgt tccgctgcgt cactacaaca tcgaccatgc gtatgagttc atcaactcgc 480
40 acgggctggc ggtgcgggca gtaggcctgc tggtagatga cgccaagacg gcgtacgagg 540
tgtctgtggc gcacggggcc aaggcgtgc tgccgccggt ggagctgcgg gatgaggcga 600
gcgccaccag ccaggtcacc tcggaggtgc tgcgtacgg cgaggtcgtg ctgcgctacg 660
tgtcgggctc cttccagggc cccttcctgg ccggctacac gcccgtcaca gactcggccg 720
45 tgacctcctt cggcctgcaa cgtctggacc acgcggtggg caacacccat gacctgatca 780
aggccgtgga gtacatcacc ggcttcacag gtttcacga gttctcagag tttgttgagg 840
aggacgtggg cactgtggac agcggcctga acagcatggt gctggcctcc aacaacgagg 900
50 cagtgtgct gctgtgaac gagcccacct ttggcacgcc gcgcaagagc caaatccaga 960
cctacctgga gcagaacgag gggccggggc tgcagcacct ggcgctgctc agcaacgaca 1020
tcttcaccac cctgcgggag atgcgcgcgc gcagcgagct gggtagcttc gagttcatgc 1080
cacgggcaaa tgccaagtac tacaagaca tgtacgcccg catcggcgac tcgctcacgc 1140
55 cgcagcagta caggagggtg gaggagctgg gcatcctggt ggacaaggac gaccagggcg 1200
tgctgctgca gatcttcacc aagccgctgg gcgaccggcc cacggtgttt attgagatca 1260
tccagcgtgt gggctgcatg cgggaggtga aagagcctgc tacgggagct gtgggtgggga 1320
60 cggagcaggc ggctggctgc ggcggcttcg gaaaaggcaa ctctcgtgcc ctctcaagt 1380
ccattgagga ctatgagcgc accttaaatg tttaagctga ttgtaactga agtcacggga 1440
attagaatgc agatagaaac aaccggaagg tgacagagagc cagcggacta ccaggacttg 1500
65 caaatgacag tgattcaaac aatgcaatc acccggtagt tgaagtgtac cgcgttctta 1560

ES 2 275 365 B1

```

ctaggcaagg tgcgaagagg gctgacgtga tgcgctggtg ttctggtgtc agggatgaa 1620
gctggttgcgc gctggttgcag gacgagttgc aggctggtgt gtgcaagggg ttaagaggtt 1680
gtgagtgttt gcagttacag agggtgccgc caggcgggtga gggcaagaac taaccgggtac 1740
5 gtaatgatag atgccagcag gatttgggga tgagcaggag ggatttgcca gttgcccagg 1800
catccttatg gagtcatggt gtatgcgcgg caagatcg 1838

```

```

10 <210> 2
    <211> 432
    <212> PRT
    <213> Chlamydomonas
15 <400> 2

```

```

20 Met Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr Gly Asp Arg Glu Gly Gly Ile Lys
    1          5          10          15
25 Leu Val Gly Tyr Lys Asn Phe Val Arg Gln Asn Pro Leu Ser Asp Lys
    20          25          30
30 Phe Thr Val His Lys Phe His His Ile Asp Phe Trp Cys Gly Asp Ala
    35          40          45
35 Thr Asn Thr Ser Lys Arg Phe Ser Tyr Gly Leu Gly Met Pro Leu Val
    50          55          60
40 Ala Lys Ser Asp Gln Ser Thr Asn Asn Gln Leu Phe Ala Ser Tyr Val
    65          70          75          80
45 Leu Arg Ser Asn Asp Leu Val Phe Thr Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Arg
    85          90          95
50 Lys Cys Ala Ser Val Ser Glu Gly Val Pro Leu Arg His Tyr Asn Ile
    100         105         110
55 Asp His Ala Tyr Glu Phe Ile Asn Ser His Gly Leu Ala Val Arg Ala
    115         120         125
60 Val Gly Leu Leu Val Asp Asp Ala Lys Thr Ala Tyr Glu Val Ser Val
    130         135         140
65 Ala His Gly Ala Lys Gly Val Leu Pro Pro Val Glu Leu Arg Asp Glu
    145         150         155         160
    Ala Ser Gly Thr Ser Gln Val Ile Ser Glu Val Leu Leu Tyr Gly Glu
    165         170         175
70 Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Gly Ser Phe Gln Gly Pro Phe Leu Ala
    180         185         190

```

ES 2 275 365 B1

Gly Tyr Thr Pro Val Thr Asp Ser Ala Val Thr Ser Phe Gly Leu Gln
 195 200 205

5

Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Thr His Asp Leu Ile Lys Ala Val
 210 215 220

10

Glu Tyr Ile Thr Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ser Glu Phe Val
 225 230 235 240

15

Ala Glu Asp Val Gly Thr Val Asp Ser Gly Leu Asn Ser Met Val Leu
 245 250 255

20

Ala Ser Asn Asn Glu Ala Val Leu Leu Pro Val Asn Glu Pro Thr Phe
 260 265 270

25

Gly Thr Pro Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Asn Glu
 275 280 285

30

Gly Pro Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Leu Ser Asn Asp Ile Phe Thr
 290 295 300

35

Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Glu Leu Gly Gly Phe Glu Phe
 305 310 315 320

40

Met Pro Arg Ala Asn Ala Lys Tyr Tyr Lys Asp Met Tyr Ala Arg Ile
 325 330 335

45

Gly Asp Ser Leu Thr Pro Gln Gln Tyr Arg Glu Val Glu Glu Leu Gly
 340 345 350

50

Ile Leu Val Asp Lys Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr
 355 360 365

55

Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Val Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg
 370 375 380

60

Val Gly Cys Met Arg Glu Val Lys Glu Pro Ala Thr Gly Ala Val Val
 385 390 395 400

65

Gly Thr Glu Gln Ala Ala Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe
 405 410 415

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

<210> 3

<211> 21

ES 2 275 365 B1

<212> ADN

<213> Chlamydomonas

5 <400> 3

cacgaggcaa catcagcgct a

21

10 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Chlamydomonas

15

<400> 4

cgatcttgcc gcgcatacac

20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 275 365

② Nº de solicitud: 200301759

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/29** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9638567 A2 (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 05.12.1996	1-28
X	WO 9727285 A1 (ARIZONA BOARD OF REGENTS OF UNIVERSITY OF ARIZONA) 31.07.1997	1-28
X	WO 9749816 A1 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 31.12.1997	1-28
X	WO 9804685 A1 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 05.02.1998	1-28
X	WO 0032757 A1 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 08.06.2000	1-28
X	WO 0246387 A1 (SYNGENTA LTD) 13.06.2002	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.03.2007

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/1