

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 796**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09738189 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2281051**

54 Título: **Desaturasa y método de producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos**

30 Prioridad:

30.04.2008 EP 08155461

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

28.05.2015

73 Titular/es:

**ROTHAMSTED RESEARCH LIMITED (100.0%)
Harpenden
Hertfordshire AL5 2JQ, GB**

72 Inventor/es:

**BAUER, JOERG;
NAPIER, JOHNATHAN A. y
SAYANOVA, OLGA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 796 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

Desaturasa y método de producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos

- 5 La presente invención se refiere a un polinucleótido de *Emiliana huxleyi* que codifica para una desaturasa y que puede utilizarse para la producción recombinante de ácidos grasos poliinsaturados. La invención se refiere además a vectores, células huésped y organismos no humanos transgénicos que comprenden los polinucleótidos según la invención, y a los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. La invención se refiere además a anticuerpos
- 10 contra los polipéptidos según la invención. Finalmente, la invención se refiere además a métodos de producción de los ácidos grasos poliinsaturados y de composiciones de aceites, lípidos y ácidos grasos y a la utilización de los mismos como fármacos, cosméticos, alimentos, piensos, preferentemente alimentos de pescado o complementos alimenticios.
- 15 Los ácidos grasos y triacilglicéridos presentan múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, en nutrición animal, en cosmética y en el sector farmacológico. Según si son ácidos grasos libres saturados o insaturados o son triacilglicéridos con un contenido elevado de ácidos grasos saturados o insaturados, resultan adecuados para aplicaciones muy diferentes. Los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico y el ácido linolénico resultan esenciales para los mamíferos, ya que no pueden ser producidos por ellos. Por lo tanto, los ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ y $\omega 6$ son un constituyente importante en nutrición animal y humana.
- 20 Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga $\omega 3$ tales como el ácido eicosapentaenoico (=EPA, C20:5 ^{$\Delta 5,8,11,14,17$}) o el ácido docosahexaenoico (=DHA, C22:6 ^{$\Delta 4,7,10,13,16,19$}) son componentes importantes de la nutrición humana debido a sus diversas funciones en aspectos de salud, entre ellos el desarrollo del cerebro del niño, la función ocular, la síntesis de hormonas y otras sustancias de señal, y la prevención de trastornos
- 25 cardiovasculares, cáncer y diabetes (Poulos A., Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks L.A. y Yeo Y.K., Pharmacol. Res. 40:211-225, 1999). Por ello existe una demanda de producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
- Debido a la composición actual de la alimentación humana, la adición de ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$, los cuales se encuentran preferentemente en aceites de pescado, a los alimentos resulta particularmente importante. De
- 30 esta manera, por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido docosahexaenoico (=DHA, C22:6 ^{$\Delta 4,7,10,13,16,19$}) o el ácido eicosapentaenoico (=EPA, C20:5 ^{$\Delta 5,8,11,14,17$}) se añaden a las fórmulas infantiles con el fin de mejorar el valor nutricional. Se afirma que el ácido graso insaturado DHA presenta un efecto positivo sobre el desarrollo y mantenimiento de las funciones cerebrales.
- 35 Posteriormente en la presente memoria los ácidos grasos poliinsaturados se denominan PUFA, LCPUFA (ácidos grasos poliinsaturados: PUFA; ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: LCPUFA).
- Los diversos ácidos grasos y triglicéridos se obtienen principalmente de microorganismos tales como *Mortierella* y *Schizochytrium* o de plantas productoras de aceites tales como la soja y la colza y de algas tales como
- 40 *Cryptothecodinium* o *Phaeodactylum* y otras, de las que se obtienen, como regla general, en forma de sus triacilglicéridos (=triglicéridos=triglicérols). Sin embargo, también pueden obtenerse de animales, tales como, por ejemplo, peces. Los ácidos grasos libres se preparan ventajosamente mediante hidrólisis. Los ácidos poliinsaturados de cadena muy larga, tales como DHA, EPA, ácido araquidónico (=ARA, C20:4 ^{$\Delta 5,8,11,14$}), ácido dihomo- γ -linolénico (C20:3 ^{$\Delta 8,11,14$}) o ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5 ^{$\Delta 7,10,13,16,19$}) no se sintetizan en cultivos de aceites tales como
- 45 la colza oleaginosa, la soja, el girasol o el cártamo. Las fuentes naturales convencionales de estos ácidos grasos son peces tales como el arenque, el salmón, la sardina, la gallineta, la anguila, la carpa, la trucha, el fletán, la caballa, la lucioperca o el atún, o algas.
- Según el uso pretendido, resultan preferentes aceites con ácidos grasos saturados o insaturados. En la nutrición
- 50 humana, resultan preferentes, por ejemplo, los lípidos con ácidos grasos insaturados, concretamente los ácidos grasos poliinsaturados. Se afirma que los ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ presentan un efecto positivo sobre el nivel de colesterol en la sangre y que, de esta manera, posiblemente previenen las enfermedades cardiovasculares. El riesgo de enfermedad cardíaca, ictus o hipertensión puede reducirse marcadamente mediante la adición de estos ácidos grasos $\omega 3$ a la alimentación. Además, los ácidos grasos $\omega 3$ presentan un efecto positivo sobre los procesos
- 55 inflamatorios, concretamente los crónicos, asociados a enfermedades inmunológicas tales como la artritis reumatoide. Por lo tanto, se añaden a los alimentos, concretamente a alimentos dietéticos, o se utilizan en medicamentos. Los ácidos grasos $\omega 6$ tales como el ácido araquidónico tienden a presentar un efecto negativo sobre dichos trastornos relacionados con estas enfermedades reumáticas a causa de nuestra ingesta nutricional habitual.
- 60 Los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ son precursores de hormonas de tejidos, conocidas como eicosanoides, tales como las prostaglandinas, las cuales se derivan de ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, y de los tromboxanos y leucotrienos, los cuales se derivan de ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico. Los eicosanoides (conocidos como la serie PG₂), los cuales se forman a partir de los ácidos grasos $\omega 6$, generalmente

estimulan las reacciones inflamatorias, mientras que los eicosanoides (conocidos como la serie PG₃) a partir de los ácidos grasos ω 3, presentan poco o ningún efecto proinflamatorio.

Debido a las características positivas de los ácidos grasos poliinsaturados, no se ha intentado generar genes disponibles que participen en la síntesis de ácidos grasos o triglicéridos para la producción de aceites en diversos organismos con un contenido modificado de ácidos grasos insaturados. De esta manera, el documento n° WO 91/13972 y su equivalente US describen una Δ 9-desaturasa. El documento n° WO 93/11245 reivindica una Δ 15-desaturasa y el documento n° WO 94/11516, una Δ 12-desaturasa. Se describen desaturadas adicionales en, por ejemplo, los documentos n° EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222 y EPA-0 794 250; Stuckey *et al.*, J. Biol. Chem. 265:20144-20149, 1990; Wada *et al.*, Nature 347:200-203, 1990; o Huang *et al.*, Lipids 34:649-659, 1999. Sin embargo, la caracterización bioquímica de las diversas desaturasas ha resultado insuficiente hasta hoy porque los enzimas, al ser proteínas unidas a membrana, suponen una gran dificultad de aislamiento y caracterización (McKeon *et al.*, Methods in Enzymol. 71: 12141-12147, 1981; Wang *et al.*, Plant Physiol. Biochem. 26: 777-792, 1988). Como regla general, las desaturasas unidas a membrana se caracterizan mediante la introducción en un organismo adecuado que posteriormente se analiza para la actividad enzimática mediante el análisis de las materias primas y los productos. Las Δ 6-desaturasas se describen en los documentos n° WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00/21557 y WO 99/27111. Su aplicación a la producción en organismos transgénicos se describe en, por ejemplo, los documentos n° WO 98/46763, WO 98/46764 y WO 98/46765. En este contexto, la expresión de diversas desaturasas y la formación de ácidos grasos poliinsaturados también se encuentra descrita y reivindicada; ver, por ejemplo, los documentos n° WO 99/64616 y WO 98/46776. Con respecto a la eficacia de expresión de las desaturasas y su efecto sobre la formación de los ácidos grasos poliinsaturados, debe indicarse que la expresión de una sola desaturasa tal como se ha descrito hasta hoy sólo ha resultado en un contenido bajo de ácidos grasos/lípidos insaturados, tales como, por ejemplo, el ácido γ -linolénico y el ácido esteáridónico. Además, se obtuvo una mezcla de ácidos grasos ω 3 y ω 6, como regla general.

Son microorganismos especialmente adecuados para la producción de los PUFA, microalgas tales como *Phaeodactylum tricornutum*, especies de *Porphyridium*, especies de *Thraustochytrium*, especies de *Schizochytrium* o especies de *Cryptocodinium*, ciliados tales como *Stylonychia* o *Colpidium*, hongos tales como *Mortierella*, *Entomophthora* o *Mucor* y/o musgos tales como *Physcomitrella*, *Ceratodon* y *Marchantia* (R. Vazhappilly y F. Chen Botánica Marina 41: 553-558, 1998; K. Totani y K. Oba, Lipids 22: 1060-1062, 1987; M. Akimoto *et al.*, Biochemistry and Biotechnology 73:269-278, 1998. 269-278). La selección de cepas ha resultado en el desarrollo de varias cepas mutantes de los microorganismos en cuestión que producen una serie de compuestos deseables, incluyendo los PUFA. Sin embargo, la mutación y selección de cepas con una producción mejorada de una molécula particular, tal como los ácidos grasos poliinsaturados, es un método laborioso y difícil. Por ello resultan preferentes los métodos recombinantes, tales como los indicados anteriormente, siempre que resulte posible. Sin embargo, sólo pueden producirse cantidades limitadas de los ácidos grasos poliinsaturados deseados, tales como DPA, EPA o ARA, con la ayuda de los microorganismos anteriormente indicados. Además, dependiendo del microorganismo utilizado, estos generalmente se generan en forma de mezclas de ácidos grasos, de, por ejemplo, EPA, DPA y ARA.

Se está debatiendo una diversidad de rutas sintéticas para la síntesis de ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). De esta manera, EPA o DHA son producidos en bacterias marinas tales como *Vibrio* sp. o *Shewanella* sp. mediante la ruta de poliquétidos (Yu R. *et al.*, Lipids 35:1061-1064, 2000; Takeyama H. *et al.* Microbiology 143:2725-2731, 1997).

Una estrategia alternativa es la actividad alternante de las desaturasas y las elongasas (Zank T.K. *et al.*, Plant Journal 31:255-268, 2002; Sakuradani E. *et al.*, Gene 238:445-453, 1999). Una modificación de esta ruta a través de Δ 6-desaturasa, Δ 6-elongasa, Δ 5-desaturasa, Δ 5-elongasa y Δ 4-desaturasa es la ruta de Sprecher (Sprecher, Biochim. Biophys. Acta 1486:219-231, 2000) en mamíferos. En lugar de la Δ 4-desaturación, se lleva a cabo una etapa de elongación adicional, proporcionando C₂₄, seguido de una Δ 6-desaturación adicional y finalmente una β -oxidación, proporcionando la longitud de cadena C₂₂. Sin embargo, lo que se conoce como ruta de Sprecher, no resulta adecuada para la producción en plantas y microorganismos, ya que todavía no se conocen los mecanismos de regulación.

Según su patrón de desaturación, los ácidos grasos poliinsaturados pueden dividirse en dos grandes clases: los ácidos grasos ω 6 y ω 3, que difieren con respecto a sus actividades metabólicas y funcionales. La materia prima para la ruta metabólica de ω 6 es el ácido graso ácido linoleico (18:2 ^{Δ 9,12}), mientras que la ruta Δ 3 transcurre a través del ácido linolénico (18:3 ^{Δ 9,12,15}). El ácido linolénico se forma por la actividad de una Δ 15-desaturasa (Tocher *et al.*, Prog. Lipid Res. 37:73-117, 1998; Domergue *et al.*, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113, 2002).

Los mamíferos y de esta manera también el ser humano, no poseen una actividad desaturasa correspondiente (Δ 12- y Δ 15-desaturasa) y deben ingerir estos ácidos grasos (ácidos grasos esenciales) a través de los alimentos. Partiendo de estos precursores, los ácidos grasos poliinsaturados fisiológicamente importantes ácido araquidónico (=ARA, 20:4 ^{Δ 5,8,11,14}), un ácido graso ω 6 y los dos ácidos grasos ω 3 ácido eicosapentaenoico (= EPA, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17})

y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6^{Δ4,7,10,13,17,19}) se sintetizan mediante la secuencia de reacción de desaturasa y elongasa. La aplicación de los ácidos grasos ω3 muestra la actividad terapéutica indicada anteriormente en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Shimikawa, World Rev. Nutr. Diet. 88:100-108, 2001), las inflamaciones (Calder, Proc. Nutr. Soc. 61:345-358, 2002) y la artritis (Cleland y James, J. Rheumatol. 27:2305-2307, 2000).

Las plantas superiores comprenden ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3). ARA, EPA y DHA no se encuentran en absoluto en el aceite de semilla de las plantas superiores, o sólo en cantidades minúsculas (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales [Nuevo diccionario de aceites vegetales]. Technique & Documentation -Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Sin embargo, la producción de los LCPUFA en plantas superiores (preferentemente en cultivos oleaginosos tales como la colza oleaginosa, lino, girasol y soja) resultaría ventajosa debido a que podrían obtenerse económicamente grandes cantidades de LCPUFA de alta calidad para la industria alimentaria, la alimentación animal y para fines farmacéuticos. Una ruta potencial es mediante métodos recombinantes, en los que se introducen y expresan genes que codifican para los enzimas de la biosíntesis de los LCPUFA. Estos genes codifican para, por ejemplo, las Δ6-desaturasas, las Δ6-elongasas, las Δ5-desaturasas o las Δ4-desaturasas. Estos genes pueden aislarse ventajosamente a partir de microorganismos y plantas inferiores que producen LCPUFA y los incorporan en las membranas o triacilglicéridos. De esta manera, ya ha sido posible aislar los genes de Δ6-desaturasa a partir del musgo *Physcomitrella patens* y los genes de Δ6-elongasa a partir de *P. patens* y del nemátodo *C. elegans* (Zank T.K. et al., Plant Journal 31:255-268, 2002; Beaudoin et al., Biochem Soc Trans 28:661-663, 2000).

Las primeras plantas transgénicas que comprenden y expresan genes codificantes de los enzimas de biosíntesis de LCPUFA y que producen los LCPUFA fueron descritas por primera vez en, por ejemplo, el documento nº DE-A-102 19 203 (método para la producción de ácidos grasos poliinsaturados en plantas). Sin embargo, estas plantas producen LCPUFA en cantidades que requieren una optimización adicional de los métodos para los aceites que se encuentran presentes en las plantas.

Por lo tanto, para posibilitar la fortificación de alimentos y de piensos con estos ácidos grasos poliinsaturados, existe una gran necesidad de un método económico y simple para la producción de estos ácidos grasos poliinsaturados, específicamente en sistemas eucarióticos.

El objetivo en que se basa la presente invención es la provisión de dichos medios y medidas. Este objetivo se consigue mediante las realizaciones que se describen en las reivindicaciones de patente y posteriormente en la presente memoria.

De esta manera, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

(a) una secuencia de ácidos nucleicos tal como se muestra en cualquiera de SEC ID nº 1,

(b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en cualquiera de SEC ID nº 2,

(c) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con un ácido nucleico de (a) o (b) bajo condiciones de hibridación restrictivas, en la que las condiciones de hibridación restrictivas son hibridaciones en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de una o más etapas de lavado en 0,2xSSC, SDS al 0,1% a 50°C-65°C y en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica para un polipéptido con actividad de Δ5-desaturasa y especificidad de acil-CoA.

Según la invención, el término "polinucleótido" se refiere a polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos con actividad de desaturasa. Las actividades de desaturasa preferentemente se requieren para la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. Especialmente preferentemente, adoptan la forma de la actividad de desaturasa siguiente: actividad de Δ5-desaturasa. La desaturasa preferentemente participa en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y especialmente preferentemente en la síntesis de los PUFA de cadena larga (LCPUFA). Los sistemas de detección adecuados para dicha actividad de desaturasa se describen en los ejemplos o en el documento nº WO 2005/083052. Los polinucleótidos específicos según la invención, es decir, el polinucleótido con una secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID nº 1 o polinucleótidos que codifican para un polipéptido con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID nº 2, se han obtenido de *Emiliana huxleyi*. El término comprende además variantes de los polinucleótidos específicos anteriormente indicados. Estas pueden adoptar la forma de secuencias homólogas, ortólogas o parálogas. Dichas variantes comprenden secuencias de ácidos nucleicos que presentan por lo menos una sustitución de base, una adición de base o una delección de base, y se pretende que las variantes todavía codifiquen para un polipéptido con la actividad biológica anteriormente indicada de la secuencia de partida respectiva. Las variantes comprenden

polinucleótidos que son capaces de hibridarse con los polinucleótidos anteriormente indicados, bajo condiciones restrictivas. Las condiciones restrictivas especialmente preferentes son conocidas por el experto en la materia y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 631-636. Un ejemplo preferente de condiciones de hibridación restrictivas son hibridaciones en 6x cloruro sódico/citrato sódico (=SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de una o más etapas de lavado en 0,2 x SSC, SDS al 0,1% a 50-65°C. El experto en la materia conoce que estas condiciones de hibridación difieren según el tipo de ácido nucleico y, por ejemplo en presencia de solventes orgánicos, con respecto a la temperatura y la concentración del tampón. Bajo "condiciones de hibridación estándares", la temperatura difiere según el tipo de ácido nucleico entre 42°C y 58°C en tampón acuosa con una concentración de entre 0,1 y 5 x SSC (pH 7,2). En el caso de que el solvente orgánico se encuentre presente en el tampón anteriormente indicado, por ejemplo formamida al 50%, la temperatura bajo condiciones estándares es de aproximadamente 42°C. Las condiciones de hibridación para los híbridos de ADN:ADN preferentemente son de, por ejemplo, 0,1 x SSC y 20°C a 45°C, preferentemente 30°C a 45°C. Las condiciones de hibridación para los híbridos ADN:ARN preferentemente son, por ejemplo, 0,1 x SSC y 30°C a 55°C, preferentemente 45°C a 55°C. Las temperaturas de hibridación anteriormente indicadas se determinan, por ejemplo, para un ácido nucleico de longitud aproximada 100 pb (=pares de bases) y un contenido de G + C de 50% en ausencia de formamida. El experto en la materia conoce cómo determinar las condiciones de hibridación requeridas con ayuda de libros de texto, tales como el mencionado anteriormente en la presente memoria, o a partir de las obras siguientes: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames and Higgins (eds.) 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed.) 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford. A modo de alternativa, las variantes de los polinucleótidos específicos según la invención también pueden proporcionarse mediante métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con este fin resulta posible derivar en primer lugar cebadores a partir de secuencias conservadas (por ejemplo secuencias que codifican para dominios funcionales en el polipéptido). Las secuencias conservadas pueden determinarse mediante comparaciones entre secuencias con polinucleótidos que codifican para polipéptidos que presentan una actividad similar. El molde utilizado puede ser ADN o ADNc de bacterias, hongos, plantas o animales. Los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR pueden utilizarse para cribar bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADNc adecuadas con el fin de, si se requiere, aislar el marco de lectura abierto completo del polinucleótido y para determinarlo mediante secuenciación. Las variantes descritas comprenden polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos con una identidad de por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% (o un porcentaje diferente del indicado en la presente memoria), con una de las secuencias de ácidos nucleicos específicos anteriormente indicados y codifican para un polipéptido con la actividad biológica respectiva. También se describen polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% (o un porcentaje diferente de los indicados en la presente memoria), respecto a una de las secuencias de aminoácidos específicas anteriormente indicadas y en los que el polipéptido presenta la actividad biológica respectiva de la secuencia inicial.

El porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos preferentemente se refiere a un segmento de secuencia de por lo menos 50% de las secuencias que deben compararse, y especialmente preferentemente en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Se describe en la técnica anterior una multiplicidad de programas que implementan algoritmos para dichas comparaciones y que se encuentran disponibles comercialmente. En particular, puede hacerse referencia a los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman, que proporcionan resultados particularmente fiables. Estos algoritmos preferentemente pueden implementarse mediante los programas siguientes: PileUp (J. Mol. Evolution 25:351-360, 1987; Higgins, CABIOS 5:151-153, 1989), Gap y BestFit (Needleman J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970, y Smith, Adv. Appl. Math. 2; 482-489, 1981), como parte del software del GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, 1991). Para los fines de la presente invención, resulta especialmente preferente determinar el porcentaje (%) de la identidad de secuencias con el programa GAP en la secuencia completa, con los parámetros fijados siguientes: Penalización por creación de hueco: 50, penalización por extensión de hueco: 3, promedio de correspondencia: 10,000 y promedio de no correspondencia: 0,000.

Un polinucleótido que sólo comprende un fragmento de las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente indicadas también es un polinucleótido según la invención. En la presente memoria se pretende que el fragmento codifica para un polipéptido que presenta la actividad biológica de la secuencia inicial, o del polipéptido que ésta codifica. Por lo tanto, los polipéptidos que están codificados por dichos polinucleótidos comprenden, o consisten de, dominios de los polipéptidos específicos anteriormente indicados (polipéptidos iniciales), que confieren la actividad biológica. Un

fragmento para los fines de la invención preferentemente comprende por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 250 o por lo menos 500 nucleótidos consecutivos de las secuencias específicas anteriormente indicadas o codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 50, por lo menos 80, por lo menos 100 o por lo menos 150 aminoácidos consecutivos de una de las secuencias de aminoácidos específicas indicadas anteriormente, y confiere actividad biológica, preferentemente actividad de desaturasa, tal como se ha indicado anteriormente.

La expresión "actividad de desaturasa" tal como se utiliza en el presente contexto se refiere a una actividad enzimática por la que se cataliza una hidrogenación de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos como sustratos. La actividad de desaturasa según la invención preferentemente adopta la forma de delta-5-desaturasa (también denominada actividad de $\Delta 5$ -desaturasa). Las $\Delta 5$ -desaturasas son enzimas con la función enzimática de hidrogenación de los ácidos grasos C_{20} que se hidrogenan en el átomo de C 8-9. En estos, los átomos de C C5 y C6 son hidrogenados, en cada caso un átomo de hidrógeno, dando lugar a un doble enlace entre los dos átomos de C. Resulta especialmente preferente que los enzimas con actividad de desaturasa (y en particular con actividad de $\Delta 5$ -desaturasa) dentro del significado de la presente invención conviertan la acil-coenzima A como sustrato.

Las variantes de polinucleótido según la invención preferentemente presentan por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de la actividad biológica respectiva del polipéptido que está codificado por la secuencia inicial. Es decir, los polipéptidos que están codificados por los polinucleótidos según la invención pueden participar en el metabolismo de compuestos requeridos para la síntesis de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos tales como diacilglicéridos y/o triacilglicéridos en un organismo, preferentemente en una planta o célula vegetal, o pueden participar en el transporte de moléculas a través de membranas, es decir cadenas de carbonos C_{18} , C_{20} o C_{22} en la molécula de ácido graso con dobles enlaces en por lo menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis posiciones.

Los polinucleótidos según la invención comprenden o consisten de las secuencias de ácidos nucleicos específicas anteriormente indicadas. Es decir, los polinucleótidos según la invención pueden comprender además, en principio, nucleótidos adicionales. Estos preferentemente pueden ser regiones 3'- o 5'-no traducidas de la secuencia genómica de ácidos nucleicos. Preferentemente consisten de por lo menos 100, 200 o 500 nucleótidos en el extremo 5'-terminal y por lo menos 20, 50 o 100 nucleótidos en el extremo 3'-terminal de la región codificante. Son polinucleótidos adicionales que comprenden secuencias de ácidos nucleicos adicionales, aquellos que codifican para proteínas de fusión. Dichas proteínas de fusión pueden codificar para polipéptidos adicionales o partes de polipéptido, además de los polipéptidos anteriormente indicados. El polipéptido o parte de polipéptido adicional puede adoptar la forma de enzimas adicionales de biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. Otros posibles polipéptidos son polipéptidos que pueden actuar como marcadores de expresión (proteínas fluorescentes verde, amarilla, roja o azul, fosfatasa alcalina y otros) o las denominadas "etiquetas" como marcapositos como adyuvante de purificación (por ejemplo etiquetas FLAG, etiquetas 6-histidina, etiquetas MYC y otros).

Pueden aislarse variantes de polinucleótido a partir de fuentes naturales o artificiales diferentes. Por ejemplo, pueden generarse artificialmente mediante mutagénesis *in vitro* o *in vivo*. Pueden obtenerse homólogos u ortólogos de las secuencias específicas a partir de un amplio abanico de animales, plantas y microorganismos. Preferentemente se obtienen a partir de algas. Algas tales como *Isochrysis*, *Euglena* o *Cryptocodinium*, algas diatomeas tales como *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* o *Thraustochytrium*, *Pythium*, briófitos tales como *Physcomitrella* o *Ceratodon* resultan preferentes; resultan muy especialmente preferente las algas del género *Euglena* o las diatomeas de la clase *Oomycota*, tales como las de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* u hongos de la división *Zygomycota* del género *Rhizopus*. Los polinucleótidos también pueden obtenerse preferentemente de plantas superiores, tales como *Primulaceae* tales como *Aleuritia*, *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* o *Osteospermum hyoseroides*, microorganismos tales como hongos, tales como *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* o *Mortierella*, bacterias tales como *Shewanella*, levaduras o animales tales como nemátodos, por ejemplo *Caenorhabditis*, insectos o peces. Las variantes de polinucleótido también se derivan preferentemente de un animal del orden vertebrados. Especialmente preferentemente, los polinucleótidos se derivan de la clase *Vertebrata*; *Euteleostomi*, *Actinopterygii*; *Neopterygii*; *Teleostei*; *Euteleostei*, *Protacanthopterygii*, *Salmoniformes*; *Salmonidae* o *Oncorhynchus* y, muy especialmente preferentemente, del orden *Salmoniformes*, tal como la familia *Salmonidae*, tal como el género *Salmo*, por ejemplo de los géneros y especies *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* o *Salmo trutta fario*. En la presente memoria, los polinucleótidos según la invención pueden aislarse mediante técnicas estándares de la biología molecular y de la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Además, resulta posible, con ayuda de algoritmos comparativos, identificar, por ejemplo, una secuencia homóloga o regiones de secuencia conservadas al nivel del ADN o de los aminoácidos. Éstas pueden utilizarse como sonda de hibridación y en técnicas de hibridación estándares (tales como, por ejemplo, las descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para aislar secuencias de ácidos nucleicos adicionales que resultan útiles en el método. Además, resulta posible aislar polinucleótidos o fragmentos de los mismos mediante

una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que se utilizan cebadores oligonucleótidos que se basan en esta secuencia o partes de la misma (por ejemplo puede aislarse una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia completa o parte de la misma mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleótidos que han sido generados basándose en esta misma secuencia). Por ejemplo, resulta posible aislar ARNm a partir de células (por ejemplo mediante el método extractivo de tiocianato de guanidinio, Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18:5294-5299, 1979, y puede generarse ADNc mediante transcriptasa inversa (por ejemplo transcriptasa inversa del VLM de Moloney, obtenible de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o la transcriptasa inversa del VMA, obtenible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Pueden generarse cebadores oligonucleótidos sintéticos para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa basándose en las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos mostradas en los números de SEC ID. Puede amplificarse un ácido nucleico según la invención utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, a modo de molde y cebadores oligonucleótidos adecuados, siguiendo técnicas de amplificación por PCR estándares. El ácido nucleico amplificado de esta manera puede clonarse en un vector adecuado y caracterizarse mediante análisis de la secuencia del ADN. Pueden generarse oligonucleótidos que corresponden a una secuencia de nucleótidos de desaturasa, mediante métodos sintéticos estándares, por ejemplo utilizando un sintetizador de ADN automático.

Los polinucleótidos según la invención pueden proporcionarse en forma de polinucleótidos aislados (es decir, aislados a partir de su origen natural, por ejemplo el locus genómico) o en forma genéticamente modificada (es decir, los polinucleótidos también pueden encontrarse presentes en su locus genético natural aunque, en este caso, deben modificarse genéticamente). Un polinucleótido aislado preferentemente comprende menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia de ácidos nucleicos que se encuentran naturalmente en su ambiente. El polinucleótido según la invención puede encontrarse presente en forma de molécula de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena y puede presentar la forma de ADN genómico, ADNc o ARN. Preferentemente, el polinucleótido según la invención consiste de ARN o ADN. Los polinucleótidos según la invención comprenden todas las orientaciones de las secuencias mostradas en los números de SEC ID, es decir, también cadenas complementarias y orientaciones inversas o complementarias a inversas. El término comprende además ácidos nucleicos modificados químicamente, tales como las moléculas de ADN metiladas naturales, o ácidos nucleicos artificiales, por ejemplo ácidos nucleicos biotinilados.

Gracias a los polinucleótidos según la invención, los sustratos 20:4^{Δ5,8,11,14} y 20:5^{Δ5,8,11,14,17} pueden incrementarse en la producción recombinante de los PUFA de cadena larga. La Δ5-desaturasa que está codificada por el polinucleótido según la invención preferentemente cataliza la etapa de síntesis final de 20:3Δ^{8,11,14} y 20:4Δ^{8,11,14,17}, proporcionando los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga comercialmente valiosos. En el pasado se ha llevado a cabo una diversidad de enfoques para aislar las Δ5-desaturasas (por ejemplo Domergue *et al.*, Eur. J. Biochem. 269(16):4105-13, 2002; Kajikawa *et al.*, Plant Mol. Biol. 54:335-52, 2004). También ha resultado posible demostrar que la totalidad de las previamente conocidas Δ5-desaturasas utiliza el mismo portador de acilos, fosfatidilcolina (Domergue *et al.*, J. Biol. Chem. 278(37):35116-26, 2003). 278(37):35115-26). Para las Δ6-desaturasas ha sido posible demostrar que la conversión del acil-coenzima A (coenzima A portador de acilo) resulta ventajosa para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Domergue *et al.*, Biochem. J. 389(pt 2):483-90, 2005). Sin embargo, no ha sido posible hasta hoy identificar ningún enzima para la clase de las Δ5-desaturasas que sea capaz de convertir el acil-coenzima A como sustrato. Las comparaciones entre secuencias tampoco permiten predecir la especificidad de sustrato con respecto al portador de acilos. Inesperadamente ha resultado posible aislar, en el contexto de la presente invención, una secuencia del alga *Emiliana huxleyi* (Eukaryota; Haptophyceae; Isochrysidales; Noelaerhabdaceae) que codifica para un enzima con actividad de Δ5-desaturasa y que convierte sustratos de acil-coenzima A. En particular, ha emergido, ventajosamente, que los polinucleótidos según la invención pueden utilizarse con particular eficiencia para la producción recombinante de ácidos grasos poliinsaturados en células huésped y organismos transgénicos. En particular, los polipéptidos con actividad de Δ5-desaturasa que están codificados por el polinucleótido según la invención son capaces de ácidos grasos C₁₈, C₂₀ y C₂₂ con dos, tres, cuatro o cinco dobles enlaces y preferentemente ácidos grasos C₂₀ poliinsaturados con tres o cuatro dobles enlaces, tales como C20:3^{Δ8,11,14} o C20:4^{Δ8,11,14,17}. Las secuencias de polinucleótido y de aminoácidos según la invención conducen especialmente preferentemente a un incremento de los ácidos grasos 20:4Δ^{5,8,11,14} (ácido araquidónico) y 20:5Δ^{5,8,11,14,17} (ácido eicosapentaenoico).

También se describen oligonucleótidos de por lo menos 15 pb, preferentemente de por lo menos 20 pb, por lo menos 25 pb, por lo menos 30 pb, por lo menos 35 pb o por lo menos 50 pb, que son capaces de hibridarse específicamente bajo condiciones restrictivas con uno de los polinucleótidos anteriormente indicados. Los oligonucleótidos pueden consistir de ADN o ARN o de ambos. Dichos oligonucleótidos pueden utilizarse como cebadores para la PCR, como oligonucleótidos antisentido inhibidores de la expresión, para enfoques de ARN interferente (ARNi) o para enfoques quimeroplásticos o genoplásticos. Los métodos de ARNi se describen en, por ejemplo, Fire *et al.*, Nature 391:806-811, 1998; Fire, Trends Genet. 15:358-363, 1999; Sharp, RNA interference, Genes Dev. 15:485-490, 2001; Hammond *et al.*, Nature Rev. Genet. 2:1110-1119, 2001; Tuschl, Chem. Biochem. 2:239-245, 2001; Hamilton *et al.*, Science 286:950-952, 1999; Hammond *et al.*, Nature 404:293-296, 2000; Zamore *et al.*, Cell 101:25-33, 2000; Bernstein *et al.*, Nature 409:363-366, 2001; Elbashir *et al.*, Genes Dev. 15:188-200,

2001; documentos nº WO 01/29058 y nº WO 99/32619, o Elbashir *et al.*, Nature 411: 494-498, 2001, y sirven para inhibir la expresión génica mediante degradación del ARNm. Los enfoques quimeroplásticos o genoplásticos dirigen la modificación *in vivo* (por ejemplo la introducción de mutaciones puntuales) introduciéndola en los genes en sus loci endógenos. Se dan a conocer métodos correspondientes en las patentes US nº 5.565.350, nº 5.756.325, nº 5.871.984, nº 5.731.181, nº 5.795.972, nº 6.573.046, nº 6.211.351, nº 6.586.184, nº 6.271.360 y nº 6.479.292.

En este contexto, resulta especialmente preferente utilizar la $\Delta 6$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 5 (d6Des(Pir)), la $\Delta 6$ -elongasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 7 (d6Elo(Pp)), la $\Delta 5$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 1 (dSDes(Eh)), la $\Delta 12$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 9 (d12Des(Ps)), la $\Delta 15$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 13 (d15Des(Perf)), la $\omega 3$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 11 ($\omega 3$ Des(Pi)), la $\Delta 5$ -elongasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 15 (d5Elo(Ot)) y la $\Delta 4$ -desaturasa codificada por la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 17 (d4Des(Tc)) con la desaturasa según la invención con el fin de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los polinucleótidos anteriormente indicados se describen en el documento nº WO 2006/100241. Alternativamente, también resulta posible utilizar una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 8$ -desaturasa en lugar de la $\Delta 6$ -desaturasa y $\Delta 6$ -elongasa anteriormente indicadas, tal como se indica en el documento nº WO 2004/057001. Según el ácido graso que deba prepararse, resulta posible coexpresar, en las células huésped u organismos transgénicos indicados posteriormente en la presente memoria, o utilizar en los métodos según la invención, una diversidad de combinaciones de los polinucleótidos según la invención con las desaturasas o elongasas anteriormente indicadas. Las combinaciones especialmente preferentes para la producción de ácido araquidónico en la Tabla 1, para el ácido eicosapentaenoico en la Tabla 2 y para el ácido docosahexaenoico en la Tabla 3, se detallan posteriormente en la presente memoria. Por ejemplo, resulta posible utilizar la $\Delta 5$ -desaturasa según la invención, sola o en una combinación adecuada (por ejemplo una $\Delta 12$ -desaturasa y una $\Delta 15$ -desaturasa), conjuntamente con d6Des(Pir), d6Elo(Pp), d5Des(Tc), $\Delta 3$ Des(Pi) para la producción de EPA. Igualmente, la $\Delta 5$ -desaturasa según la invención, sola o en una combinación adecuada, puede utilizarse conjuntamente con d6Des(Pir), d6Elo(Pp), d5Des(Tc), $\omega 3$ Des(Pi), d5Elo(Ot), d4Des(Tc) para la producción de ácido docosahexaenoico.

Preferentemente, son los ácidos grasos en fosfolípidos o ésteres de ácido graso-CoA los que se desnaturalizan, ventajosamente en los ésteres de ácido graso-CoA. De esta manera, resulta posible una producción económica y sencilla de estos ácidos grasos poliinsaturados, concretamente en sistemas eucarióticos. Los ácidos grasos insaturados producidos mediante los polinucleótidos según la invención seguidamente pueden formularse como composiciones de aceites, lípidos y ácidos grasos y pueden utilizarse de una manera adecuada.

La presente invención se refiere además a un vector que comprende el polinucleótido según la invención.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que es capaz de transportar otra molécula de ácidos nucleicos, tal como los polinucleótidos según la invención, a la que se encuentran unidos. Un tipo de vector es un "plásmido", un bucle de ADN circular de doble cadena en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Un tipo adicional de vector es un vector vírico, siendo posible ligar segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo vectores bacterianos con origen de replicación bacteriano). Otros vectores se integran ventajosamente en el genoma de una célula huésped al introducirlos en la célula huésped y de esta manera se replican conjuntamente con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden controlar la expresión de genes con los que se encuentran en ligamiento operable. Estos vectores se denominan en el presente contexto, "vectores de expresión". Habitualmente, los vectores de expresión que resultan adecuados para las técnicas de recombinación de ADN adoptan la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiabilmente, ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más frecuentemente. Sin embargo, la invención también pretende comprender otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos, que ejercen funciones similares. Además, el término "vector" también pretende comprender otros vectores que resultarán familiares para el experto en la materia, tales como fagos, virus tales como SV40, CMV, TMV, trasposones, elementos IS, fásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular y cromosomas artificiales. Finalmente, el término también comprende constructos para la recombinación dirigida, es decir homóloga, o para la inserción heteróloga de polinucleótidos.

Los vectores pueden introducirse en las células procarióticas y eucarióticas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción, tal como se utilizan en el presente contexto, pretenden comprender una multiplicidad de métodos conocidos de la técnica anterior para la introducción de ácidos nucleicos foráneos (por ejemplo ADN) en una célula huésped, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección, la competencia natural, la transferencia mediada químicamente, la electroporación o el bombardeo con partículas. Pueden encontrarse métodos adecuados para la transformación o transfección de células huésped, incluyendo células vegetales, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2a ed., Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorio, tales como *Methods in Molecular Biology*, 1995, vol. 44, *Agrobacterium protocols*, Ed.: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Los vectores de clonación adecuados son generalmente conocidos por el experto en la materia. En particular, incluyen vectores que pueden replicarse en sistemas microbianos, es decir, principalmente vectores que garantizan una clonación eficiente en levaduras u hongos y que permiten la transformación estable en plantas. Los que deben mencionarse son, en particular, diversos sistemas de vectores binarios y cointegrados que resultan adecuados para la transformación mediada por ADN-T. Dichos sistemas de vectores se caracterizan, por regla general, porque comprenden por lo menos los genes *vir*, los cuales resultan necesarios para la transformación mediada por *Agrobacterium*, y las secuencias límite de ADN-T (límite de ADN-T). Preferentemente, estos sistemas de vectores comprenden además regiones reguladoras en cis adicionales, tales como promotores y terminadores y/o marcadores de selección, mediante los cuales pueden identificarse los organismos adecuadamente transformados. Aunque en el caso de los sistemas de vectores cointegrados, los genes *vir* y las secuencias de ADN-T están dispuestas en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en por lo menos dos vectores, uno de los cuales porta genes *vir*, pero no ADN-T, y el otro porta ADN-T, pero ningún gen *vir*. En consecuencia, los últimos vectores mencionados son relativamente pequeños, fáciles de manipular y replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Entre estos vectores binarios se incluyen vectores de la serie pBIB-HYG, la serie pPZP, la serie pBecks y la serie pGreen. Los utilizados preferentemente según la invención son Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV y pCambia. Una vista general de los vectores binarios y su utilización puede encontrarse en Hellens *et al.*, *Trends in Plant Science* 5:446-451, 2000. Los vectores con los polinucleótidos insertados según la invención pueden propagarse establemente bajo condiciones selectivas en microorganismos, en particular *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y permiten la transferencia de ADN heterólogo a plantas o microorganismos. Los polinucleótidos según la invención pueden introducirse en organismos, tales como microorganismos o plantas, mediante vectores de clonación y utilizarse de esta manera para transformar plantas. Los vectores que resultan adecuados para este fin han sido publicados en: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), capítulo 6/7, p. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*, en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes *et al.*, *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42:205-225, 1991.

El vector preferentemente es un vector de expresión. El polinucleótido se encuentra presente en el vector de expresión según la invención en ligamiento operativo (es decir, funcional) con una secuencia de control de la expresión. La secuencia de control de la expresión conjuntamente con el polinucleótido y opcionalmente elementos de secuencia adicionales del vector también se denomina casete de expresión. La secuencia de control de la expresión garantiza que, tras la transformación o transfección en una célula huésped, pueda expresarse el polinucleótido. La secuencia de control de la expresión que debe utilizarse preferentemente comprende elementos reguladores en cis, tales como secuencias de ácidos nucleicos de promotor y/o de intensificador, que son reconocidas por la maquinaria de transcripción de las células huésped. El término comprende además otros elementos de control de la expresión, por ejemplo señales de poliadenilación y secuencias estabilizadoras del ARN. Estas secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o ver: Gruber and Crosby, en: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick y Thompson, capítulo 7, 89-108, incluyendo la literatura citada en el mismo. Las secuencias de control de la expresión comprenden aquellas que controlan la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que controlan la expresión directa de la secuencia de nucleótidos únicamente en determinadas células huésped bajo determinadas condiciones. El experto en la materia conoce que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que debe transformarse, el grado de la expresión de la proteína deseada y similares. Los polinucleótidos según la invención pueden encontrarse presentes en una o más copias en el casete de expresión o en el vector de expresión según la invención (por ejemplo en forma de varios casetes de expresión). En la presente memoria, las secuencias o factores reguladores preferentemente pueden presentar un efecto positivo sobre la expresión génica de los genes introducidos, tal como se ha indicado anteriormente, y de esta manera incrementarla. De esta manera, resulta posible intensificar los elementos reguladores ventajosamente al nivel de transcripción mediante la utilización de señales de transcripción fuertes, tales como promotores y/o "intensificadores". Por otra parte, también resulta posible intensificar la traducción, por ejemplo mejorando la estabilidad del ARNm. Son secuencias de control de la expresión adicionales dentro del significado de la presente invención los terminadores de traducción en el extremo 3' de los polinucleótidos que deben traducirse. Un ejemplo que puede utilizarse en la presente memoria es el terminador OCS1. Tal como en el caso de los promotores, debe utilizarse una secuencia terminadora diferente para cada polinucleótido que debe expresarse.

Las secuencias de control de la expresión o secuencias reguladoras preferentes se encuentran presentes en promotores tales como los promotores *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, SP6, λ -PR o λ -PL, y se utilizan ventajosamente en las bacterias Gram-negativas. Se encuentran presentes secuencias

reguladoras ventajosas adicionales en, por ejemplo, los promotores Gram-positivos amy y SPO2, en los promotores de levaduras o fúngicos ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH o en los promotores vegetales CaMV/35S [Franck *et al.*, Cell 21:285-294, 1980], PRP1 [Ward *et al.*, Plant. Mol. Biol. 22, 1993], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o en el promotor ubiquitina o faseolina. En el presente contexto también resultan ventajosos los promotores inducibles, tales como los promotores indicados en el documento n° EP-A-0 388 186 (inducible por bencenosulfonamida), Plant J. 2:397-404, 1992 (Gatz *et al.*, inducida por tetraciclina), en el documento n° EP-A-0 335 528 (inducible por ácido abscísico) o en el documento n° WO 93/21334 (inducible por etanol o ciclohexenol). Son promotores vegetales adecuados adicionales el promotor FBPasa citosólico o el promotor ST-LSI de la patata (Stockhaus *et al.*, EMBO J. 8:2445, 1989), el promotor fosforibosilpírofosfato amidotransferasa de *Glycine max* (Genbank n° de acceso U87999) o el promotor específico de nodo descrito en el documento n° EP-A-0 249 676. Son promotores especialmente ventajosos los promotores que permiten la expresión en tejidos que participan en la biosíntesis de los ácidos grasos. Resultan especialmente ventajosos los promotores específicos de semilla, tales como el promotor USP, aunque también otros promotores tales como los promotores LeB4, DC3, faseolina o napina. Son promotores especialmente ventajosos adicionales los promotores específicos de semillas que pueden utilizarse para las plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas y que se describen en la patente US n° 5.608.152 (promotor napina de la colza oleaginosa), en el documento n° WO 98/45461 (promotor de oleosina de *Arabidopsis*), en la patente US n° 5.504.200 (promotor faseolina de *Phaseolus vulgaris*), en el documento n° WO 91/13980 (promotor Bce4 de *Brassica*), por Baumlein *et al.*, Plant J. 2, 2:233-239, 1992 (promotor LeB4 de una leguminosa), siendo adecuados estos promotores para las dicotiledóneas. Son ejemplos de promotores que resultan adecuados para las monocotiledóneas, el promotor lpt-2 o lpt-1 de la cebada (documentos n° WO 95/15389 y n° WO 95/23230), el promotor hordeína de la cebada y otros promotores adecuados indicados en el documento n° WO 99/16890. En principio, resulta posible utilizar todos los promotores naturales conjuntamente con sus secuencias reguladoras, tales como las indicadas anteriormente, como secuencias de control de la expresión. También resulta posible utilizar promotores sintéticos, adicionalmente o por sí solos, en particular en el caso de que medien en la expresión específica de semillas, tal como se indica en, por ejemplo, el documento n° WO 99/16890.

Con el fin de alcanzar un contenido particularmente elevado de PUFA, especialmente en plantas transgénicas, los polinucleótidos de la presente invención preferentemente deberían expresarse en cultivos oleaginosos de una manera específica de semillas. Con este fin pueden utilizarse promotores específicos de semillas, o aquellos promotores que son activos en el embrión y/o en el endosperma. En principio, los promotores específicos de semillas pueden aislarse tanto de plantas dicotiledóneas como de plantas monocotiledóneas. Los promotores preferentes ventajosos se listan a continuación: USP (=proteína de semilla desconocida) y vicilina (Vicia faba) [Baumlein *et al.*, Mol. Gen. Genet. 225(3), 1991], napina (colza oleaginosa) [patente US n° 5.608.152], proteína portadora de acilo (colza oleaginosa) [patente US n° 5.315.001 y documento n° WO 92/18634], oleosina (*Arabidopsis thaliana*) [documentos n° WO 98/45461 y n° WO 93/20216], faseolina (*Phaseolus vulgaris*) [patente US n° 5.504.200], Bce4 [documento n° WO 91/13980], B4 de leguminosa (promotor LegB4) [Baumlein *et al.*, Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 y Lpt1 (cebada) [documentos n° WO 95/15389 y n° WO 95/23230], promotores específicos de semillas de arroz, maíz y trigo [documento n° WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 y aleuraina [patente US n° 5.677.474], Bce4 (colza oleaginosa) [patente US n° 5.530.149], glicinina (soja) [patente EP n° 571 741], fosfoenol piruvato carboxilasa (soja) [patente JP n° 06/62870], ADR12-2 (soja) [documento n° WO 98/08962], isocitrato liasa (colza oleaginosa) [patente US n° 5.689.040] o α -amilasa (cebada) [patente EP n° 781 849].

La expresión génica en plantas también puede facilitarse mediante un promotor inducible químicamente (ver una revisión en Gatz, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108, 1997). Los promotores inducibles químicamente resultan particularmente adecuados en el caso de que se desee que la expresión génica tenga lugar de una manera específica de un tiempo. Son ejemplos de este tipo de promotor un promotor inducible por ácido salicílico (documento n° WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz *et al.*, Plant J. 2:397-404, 1992) y un promotor inducible por etanol.

Para garantizar una integración estable de los diversos genes de biosíntesis en la planta transgénica durante una pluralidad de generaciones, cada uno de los polinucleótidos según la invención debe expresarse bajo el control de un promotor separado, preferentemente un promotor que difiera de los demás promotores, ya que los motivos de secuencia repetitivos pueden conducir a inestabilidad del ADN-T o a sucesos de recombinación. En este contexto, el casete de expresión se construye ventajosamente de manera que tras un promotor siga un sitio de corte adecuado (ventajosamente en un policonector) para la inserción del ácido nucleico que debe expresarse y, en su caso, se sitúa seguidamente un terminador detrás del policonector. Esta secuencia se repite varias veces, preferentemente tres, cuatro o cinco veces, de manera que pueden combinarse hasta cinco genes en un constructo e introducirse en la planta transgénica con el fin de expresarse. Ventajosamente, la secuencia se repite hasta tres veces. Para expresar las secuencias de ácidos nucleicos, éstas se insertan detrás del promotor mediante un sitio de corte adecuado, por ejemplo en el policonector. Ventajosamente, cada secuencia de ácidos nucleicos presenta su propio promotor y, en su caso, su propio terminador. Dichos constructos ventajosos se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes DE n° 101 02 337 o n° 101 02 338. Sin embargo, también resulta posible insertar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos detrás de un promotor y, en su caso, delante de un terminador. En la presente memoria, el sitio de

inserción, o la secuencia de los ácidos nucleicos insertados en el casete de expresión no resultan de importancia crítica, es decir, puede insertarse una secuencia de ácidos nucleicos en la primera o en la última posición en el casete sin que su expresión se vea sustancialmente influida por ello. Ventajosamente, pueden utilizarse en el casete de expresión diferentes promotores, tales como, por ejemplo, los promotores USP, LegB4 o DC3, y diferentes terminadores. Sin embargo, también resulta posible utilizar solo un tipo de promotor en el casete. Sin embargo, ello podría conducir a sucesos de recombinación no deseados.

Los vectores de expresión recombinante utilizados pueden diseñarse para la expresión en células procarióticas o eucarióticas. Ello resulta ventajosa ya que con frecuencia se llevan a cabo etapas intermedias de construcción del vector en los microorganismos en aras de la simplicidad. Por ejemplo, los genes de la $\Delta 12$ -desaturasa, la $\Delta 15$ -desaturasa, las $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas, la $\omega 3$ -desaturasa, la $\Delta 6$ -desaturasa, la $\omega 6$ -elongasa, la $\omega 9$ -elongasa, la $\Delta 8$ -desaturasa, la $\Delta 5$ -desaturasa, la $\omega 5$ -elongasa y/o la $\Delta 4$ -desaturasa pueden expresarse en células bacterianas, células de insecto (utilizando vectores de expresión baculovíricos), células de levaduras y otras células fúngicas (ver Romanos M.A. *et al.*, "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488, 1992; van den Hondel C.A.M.J.J. *et al.*, "Heterologous gene expression in filamentous fungi", en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Eds., páginas 396-428: Academic Press: San Diego, 1991; y en van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J., "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy J.F. *et al.*, Eds., páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), 1991; algas (Falcatore *et al.*, *Marine Biotechnology* 3:239-251, 1999), ciliados de los tipos: *Holotrichia*, *Peritrichia*, *Spirotrichia*, *Suctorina*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucoma*, *Platyophrya*, *Potomacus*, *Desaturaseudocohnilembus*, *Euplotes*, *Engelmanniella* y *Stylonychia*, en particular de la especie *Stylonychia lemnae*, utilizando vectores en un método de transformación tal como se describe en el documento n° WO 98/01572 y, preferentemente, en células de plantas multicelulares (ver Schmidt, R. and Willmitzer, L., "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586, 1988; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, capítulo 6/7, páginas 71-119, 1993; F.F. White, B. Jené *et al.*, *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, Eds.: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42:205-225, 1991 (y referencias citadas en los mismos)). Se comentan en mayor detalle las células huésped adecuadas en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990. Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras de promotor de T7 y polimerasa de T7.

En la mayoría de casos, la expresión de proteínas en procariotas implica la utilización de vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles que controlan la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos son, entre otros, pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), en los que la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína E de unión a maltosa y la proteína A, respectivamente, se encuentran fusionadas con la proteína diana recombinante. Son ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados, entre otros, pTrc (Amann *et al.*, *Gene* 69:301-315, 1988) y pET 11 d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California, 1990, 60-89). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión híbrido trp-lac por parte de la ARN polimerasa del huésped. La expresión del gen diana a partir del vector pET 11 d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7-g10-lac que está mediado por una ARN polimerasa vírica (T7 gn1), que se coexpresa. La polimerasa vírica es proporcionada por las cepas de huésped BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) de un profago λ residente que aloja un gen gn1 de T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. El experto en la materia conocerá otros vectores que resultan adecuados para los organismos procarióticos; estos vectores son, por ejemplo en *E. coli*, pLG338, pACYC184, la serie pBR, tal como pBR322; la serie pUC, tal como pUC18 o pUC19; la serie M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl; en *Streptomyces*, pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361; en *Bacillus*, pUB110, pC194 o pBD214; en *Corynebacterium*, pSA77 o pAJ667.

En una realización adicional, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* comprenden pYeDesaturasec1 (Baldari *et al.*, *Embo J.* 6:229-234, 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30:933-943, 1982), pJRY88 (Schultz *et al.*, *Gene* 54:113-123, 1987) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y métodos para la construcción de vectores que resultan adecuados para la utilización en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, comprenden los que se describen en detalle en: van den Hondel C.A.M.J.J. y Punt, P.J., "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: *Applied Molecular Genetics of fungi*, 1991; J.F. Peberdy *et al.*, ed., páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, o en: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., páginas 396-428: Academic Press: San Diego]. Son vectores levaduras adecuados adicionales, por ejemplo, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLYe23.

Como alternativa, los polinucleótidos de la presente invención también pueden expresarse en células de insecto utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores baculovirus que se encuentran disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto en cultivo (por ejemplo células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith *et al.*, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165, 1983) y la serie pVL (Lucklow y Summers, Virology 170:31-39, 1989).

Los vectores de expresión vegetales preferentes comprenden los descritos en detalle en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. y Masterson, R., "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197, 1992; y Bevan, M.W., "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721, 1984; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Eds.: Kung y R. Wu, Academic press, páginas 15 a 38, 1993. Un casete de expresión vegetal preferentemente comprende secuencias de control de la expresión que son capaces de controlar la expresión de genes en células vegetales y que se encuentran ligados operablemente de manera que cada secuencia pueda completar su función, tal como la terminación transcripcional, por ejemplo señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferentes son aquellas que se derivan de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, tal como el gen 3 del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, EMBO J. 3:835 et seq., 1984), que se conoce como octopina sintasa, o equivalentes funcionales de la misma, aunque todos los demás terminadores que son funcionalmente activos en plantas también resultan adecuados. Debido a que la expresión génica en plantas muy frecuentemente no se encuentra limitada a los niveles transcripcionales, un casete de expresión en plantas preferentemente comprende otras secuencias que se encuentran ligadas operablemente, tales como intensificadores de traducción, por ejemplo la secuencia "overdrive", que comprende la secuencia líder 5' no traducida del virus del mosaico del tabaco, que incrementa la proporción proteína/ARN (Gallie *et al.*, Nucl. Acids Research 15:8693-8711, 1987). Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión génica en plantas debe encontrarse ligada operablemente a un promotor adecuado que induce la expresión génica en los tiempos correctos o de una manera específica de célula o de tejido. Los promotores utilizables son los promotores constitutivos (Benfey *et al.*, EMBO J. 8:2195-2202, 1989), tales como los que se derivan de virus vegetales, tales como 35S CAMV (Franck *et al.*, Cell 21:285-294, 1980), 19S CaMV (ver también la patente US nº 5.352.605 y el documento nº WO 84/02913), o promotores vegetales, tales como el promotor de la subunidad Rubisco pequeña, que se describe en la patente US nº 4.962.028. Otras secuencias preferentes para la utilización en el ligamiento operable en casetes de expresión génica en plantas son secuencias de reconocimiento, las cuales son necesarias para dirigir el producto génico al interior de su compartimiento celular correspondiente (ver una revisión en Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4:285-423, 1996, y referencias citadas en el mismo), por ejemplo en la vacuola, en el núcleo, todos los tipos de plastidios, tales como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, los cuerpos lipídicos, los peroxisomas y otros compartimientos de células vegetales.

Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión génica en plantas también puede facilitarse mediante un promotor inducible químicamente (ver una revisión en Gatz, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108, 1997). Los promotores inducibles químicamente resultan particularmente adecuados en el caso de que se desee que la expresión génica tenga lugar de una manera específica de un tiempo. Son ejemplos de este tipo de promotor un promotor inducible por ácido salicílico (documento nº WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz *et al.*, Plant J. 2:397-404, 1992) y un promotor inducible por etanol. Los promotores que responden a condiciones de estrés biótico o abiótico también resultan adecuados, por ejemplo el promotor génico PRP1 inducido por patógeno (Ward *et al.*, Plant. Mol. Biol. 22:361-366, 1993), el promotor hsp80 del tomate inducible térmicamente (patente US nº 5.187.267), el promotor alfa-amilasa de la patata inducible por frío (documento nº WO 96/12814) o el promotor pinII inducible por lesiones (documento nº EP-A-0 375 091).

Resultan especialmente preferentes aquellos promotores que producen la expresión génica en tejidos y órganos en los que tiene lugar la biosíntesis de ácidos grasos, lípidos y aceites, en células de semillas, tales como las células del endospermo y del embrión en desarrollo. Son promotores adecuados, el promotor génico napina de la colza oleaginosa (patente US nº 5.608.152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baeumlein *et al.*, Mol. Gen. Genet. 225(3):459-67, 1991), el promotor oleosina de *Arabidopsis* (documento nº WO 98/45461), el promotor faseolina de *Phaseolus vulgaris* (patente US nº 5.504.200), el promotor Bce4 de *Brassica* (documento nº WO 91/13980) o el promotor B4 de leguminosa (LeB4; Baeumlein *et al.*, Plant Journal 2(2):233-9, 1992) y los promotores que producen la expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas tales como el maíz, la cebada, el trigo, el centeno, el arroz y similares. Son promotores reseñables adecuados, el promotor génico lpt2 o lpt1 de la cebada (documentos nº WO 95/15389 y nº WO 95/23230) o los promotores del gen hordeína de la cebada, el gen glutelina del arroz, el gen orizina del arroz, el gen prolamina del arroz, el gen gliadina del trigo, el gen glutelina del trigo, el gen zeína del maíz, el gen glutelina de la avena, el gen kasirina del sorgo o el gen secalina del centeno, los cuales se describen en el documento nº WO 99/16890. De manera similar, son promotores especialmente adecuados, aquellos que producen la expresión específica de plastidio, ya que los plastidios son los compartimientos en los que se sintetizan los precursores y algunos de los productos finales de la biosíntesis lipídica. Los promotores adecuados, tales como el promotor ARN polimerasa vírica, se describen en los documentos nº WO 95/16783 y nº WO 97/06250, y el promotor clpP de *Arabidopsis*, descrito en el documento nº WO 99/46394.

Los vectores anteriormente indicados son sólo un pequeña muestrar de los posibles vectores que resultan adecuados. El experto en la materia conocerá plásmidos adicionales, que se describen en, por ejemplo: Cloning Vectors (eds. Pouwels P.H. *et al.*, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Para sistemas de expresión adicionales adecuados para células procarióticas y eucarióticas, ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Tal como se ha indicado anteriormente, el vector de expresión puede, además de los polinucleótidos según la invención, comprender también genes adicionales que deben introducirse en los organismos. Resulta posible y preferente introducir en los organismos huésped, y expresar en los mismos, genes reguladores tales como los genes para inductores, represores o enzimas que, como resultado de su actividad enzimática, participan en la regulación de uno o más genes de una ruta biosintética. Estos genes puede ser de origen heterólogo u homólogo. Los genes o polinucleótidos heterólogos se derivan de un organismo de un origen que difiere del origen del organismo diana en el que deben introducirse los genes o polinucleótidos. En el caso de genes o polinucleótidos homólogos, el organismo diana y el organismo de origen son idénticos. Por lo tanto, el vector preferentemente comprende por lo menos un polinucleótido adicional que codifica para un enzima adicional que participa en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. El enzima se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste de: acil-CoA deshidrogenasa(s), acil-ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa(s), acil-ACP tioesterasa(s), ácido graso aciltransferasa(s), acil-CoA:lysophospholipid aciltransferasa(s), ácido graso sintasa(s), ácido graso hidroxilasa(s), acetil-coenzima A carboxilasa(s), acil-coenzima A oxidasa(s), ácido graso desaturasa(s), ácido graso acetilnasa(s), lipoxigenasa(s), triacilglicerol lipasa(s), aleno óxido sintasa(s), hidroperóxido liasa(s), ácido graso elongasa(s), $\Delta 4$ -desaturasa(s), $\Delta 5$ -desaturasa(s), $\Delta 6$ -desaturasa(s), $\Delta 8$ -desaturasa(s), $\Delta 9$ -desaturasa(s), $\Delta 12$ -desaturasa(s), $\Delta 15$ -desaturasa(s), $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa(s), $\omega 3$ -desaturasa, $\Delta 5$ -elongasa(s), $\Delta 6$ -elongasa(s) y $\Delta 9$ -elongasa(s). Las combinaciones génicas especialmente preferentes se listan en las Tablas 5 y 6 en los ejemplos, posteriormente.

La invención se refiere además a una célula huésped que comprende el polinucleótido según la invención o el vector según la invención.

En principio, las células huésped para los fines de la presente invención pueden ser todas células eucarióticas o procarióticas. Pueden ser células primarias de animales, plantas o microorganismos multicelulares, por ejemplo de aquellos que se mencionan en otro sitio de la descripción. Adicionalmente, el término comprende además líneas celulares que pueden obtenerse de dichos organismos.

Sin embargo, las células huésped para los fines de la invención también pueden ser microorganismos unicelulares, por ejemplo bacterias u hongos. Son microorganismos especialmente preferentes los hongos seleccionados de entre el grupo de las familias *Chaetomiaceae*, *Choanephoraceae*, *Cryptococcaceae*, *Cunninghamellaceae*, *Dematiaceae*, *Moniliaceae*, *Mortierellaceae*, *Mucoraceae*, *Pythiaceae*, *Sacharomycetaceae*, *Saprolegniaceae*, *Schizosacharomycetaceae*, *Sodariaceae* o *Tuberculariaceae*. Algunos microorganismos preferentes adicionales se seleccionan de entre el grupo: *Choanephoraceae*, tales como los géneros *Blakeslea*, *Choanephora*, por ejemplo los géneros y las especies *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora infundibulifera* var. *cucurbitarum*, *Mortierellaceae*, tales como el género *Mortierella*, por ejemplo los géneros y las especies *Mortierella isabellina*, *Mortierella polycephala*, *Mortierella ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, la familia *Mucorales*, tales como los géneros y las especies *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium graminearum*, *Pythiaceae*, tales como los géneros *Phytium*, *Phytophthora*, por ejemplo los géneros y las especies *Phytium debaryanum*, *Phytium intermedium*, *Phytium irregulare*, *Phytium megalacanthum*, *Phytium paroecandrum*, *Phytium sylvaticum*, *Phytium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, *Saccharomycetaceae*, tales como los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Yarrowia*, por ejemplo los géneros y las especies *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozyma*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula nonfermentans*, *Hansenula philodendri*, *Hansenula polymorpha*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula wingei*, *Pichia alcoholophila*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bisporea*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia trehalophila*, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporeus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilae*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces*

ellipsoideus, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienipiensis*, *Saccharomycesinusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomycetaceae* tales como los géneros *Schizosaccharomyces* e.g. las especies *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, *Thraustochytriaceae* tales como los géneros *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, por ejemplo las especies *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium amoeboides*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium indicum*, *Thraustochytrium kerguelense*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium motivum*, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium rossii*, *Thraustochytrium striatum* o *Thraustochytrium visurgense*.

Igualmente preferentes como microorganismos son las bacterias seleccionadas de entre el grupo de las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* o *Rhizobiaceae*. Resulta especialmente preferente mencionar las bacterias siguientes seleccionadas de entre el grupo: *Bacillaceae*, tal como el género *Bacillus*, por ejemplo los géneros y las especies *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; *Enterobacteriaceae* tal como los géneros *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* o *Serratia*, por ejemplo los géneros y las especies *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter genomospecies*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia aphidicola*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*, *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia uredovora*, *Escherichia adecarboxylata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli*-mutabile, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia sp.*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houteanae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houteanae*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthensis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia vorans* o *Serratia rubidaea*; *Rhizobiaceae*, tales como los géneros *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, por ejemplo los géneros y las especies *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *Agrobacterium larrymoorei*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*, *Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer sahelii*, *Ensifer terengae*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium sahelii* o *Sinorhizobium xinjiangense*.

Se detallan células huésped utilizables adicionales en: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990. Se describen cepas de expresión que pueden utilizarse, por ejemplo aquellas con una actividad de proteasa más baja, en: Gottesman S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 119-128, 1990. Entre ellas se incluyen células vegetales y determinados tejidos, órganos y partes de plantas en todas sus formas fenotípicas, tales como estambres, fibras, raíces capilares, tallos, embriones, callos, cotiledones, pecíolos, material recolectado, tejido vegetal, tejido reproductivo y cultivos celulares derivados de la planta transgénica misma y/o que pueden utilizarse para generar la planta transgénica..

Pueden introducirse polinucleótidos o vectores en la célula huésped tal como se ha indicado anteriormente mediante métodos de transformación o transfección que son conocidos de la técnica anterior. Las condiciones y medios para el cultivo de las células huésped también son conocidos del experto en la materia.

La célula huésped según la invención preferentemente comprende además por lo menos un enzima adicional que participa en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. Los enzimas preferentes ya han sido mencionados en otro sitio de la descripción. El enzima puede encontrarse presente en la célula huésped en forma endógena, es decir, la célula huésped ya expresa naturalmente un gen que codifica para un enzima correspondiente. Alternativamente, también resulta posible introducir, en la célula huésped, un polinucleótido heterólogo que codifica para el enzima. Los métodos y medios adecuados para la expresión de un polinucleótido heterólogo son conocidos de la técnica anterior y se describen en la presente memoria en relación a polinucleótidos, vectores y células huésped según la invención.

La invención se refiere además a un método para generar un polipéptido con actividad de desaturasa, que comprende las etapas siguientes:

- (a) expresar un polinucleótido según la invención tal como se ha definido anteriormente en una célula huésped, y
- (b) obtener, de la célula huésped, el polipéptido que es codificado por el polinucleótido.

En el presente contexto, el polipéptido puede obtenerse o aislarse mediante todos los métodos de purificación de proteínas actuales. Los métodos comprenden, por ejemplo, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de tamiz molecular, la cromatografía líquida de alto rendimiento o la precipitación de proteínas, en su caso con anticuerpos específicos. Aunque resulte preferente, el método no debe proporcionar necesariamente una preparación de polipéptidos pura.

Por lo tanto, la invención se refiere además a un polipéptido que está codificado por el polinucleótido según la invención.

El término "polipéptido" se refiere tanto a un polipéptido esencialmente puro como también a una preparación de polipéptidos que comprende adicionalmente componentes adicionales o impurezas. El término se utiliza también para proteínas de fusión y agregados de proteínas que comprenden el polipéptido según la invención y adicionalmente componentes adicionales. El término se refiere también a polipéptidos modificados químicamente. En el presente contexto, las modificaciones químicas comprenden modificaciones artificiales o modificaciones naturales, por ejemplo modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación, la miristilación, la glucosilación y similares. Los términos polipéptido, péptido y proteína son intercambiables y de acuerdo con ello se utilizan en la descripción y en la técnica anterior. Los polipéptidos según la invención presentan las actividades biológicas anteriormente indicadas, es decir, actividades de desaturasa, y pueden influir sobre la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), preferentemente los PUFA de cadena larga (LCPUFA), tal como se indica en la presente memoria.

La invención comprende además un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID nº 2.

Los anticuerpos contra el polipéptido según la invención pueden prepararse mediante métodos conocidos, en los que el polipéptido purificado o fragmentos del mismo con epítopos adecuados se utilizan como el antígeno. Pueden determinarse epítopos adecuados mediante algoritmos conocidos para la determinación de la antigenicidad, basándose en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos según la invención proporcionados en la presente memoria. Los polipéptidos o fragmentos relevantes seguidamente pueden sintetizarse u obtenerse mediante técnicas recombinantes. Tras la inmunización de los animales, preferentemente mamíferos, por ejemplo liebres, ratas o ratones, pueden obtenerse los anticuerpos a partir del suero, utilizando métodos conocidos. Alternativamente, pueden proporcionarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos, mediante los métodos conocidos; ver, por ejemplo, Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 o Köhler y Milstein, Nature 256:495, 1975, y Galfre, Meth. Enzymol. 73:3, 1981.

Los anticuerpos preferentemente adoptan la forma de anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos quiméricos, y fragmentos de ellos, tales como Fab, Fv o scFv. Son anticuerpos adicionales dentro del significado de la invención, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos o los derivados modificados químicamente de los mismos.

Los anticuerpos según la invención reconocen específicamente los polipéptidos según la invención, es decir, no reaccionan cruzadamente en grado significativo con otras proteínas. Lo anterior puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos de la técnica anterior. Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse para los fines de reacciones de detección, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica o purificación de proteínas (por ejemplo cromatografía de afinidad).

La invención se refiere además a un organismo no humano transgénico que comprende el polinucleótido, el vector o la célula huésped de la presente invención. El organismo no humano transgénico preferentemente presenta la forma de un animal, una planta o un microorganismo multicelular.

El término "transgénico" se entiende que se refiere a que se introduce en el organismo un polinucleótido heterólogo, es decir, un polinucleótido que no se encuentra presente naturalmente en el organismo respectivo. Lo anterior puede conseguirse mediante inserción aleatoria del polinucleótido o mediante recombinación homóloga. Naturalmente, también resulta posible introducir el vector según la invención en lugar del polinucleótido. Los métodos de introducción de polinucleótidos o vectores para los fines de inserción aleatoria o recombinación homóloga son conocidos de la técnica anterior y también se describen en mayor detalle posteriormente en la presente memoria. Las células huésped que comprenden el polinucleótido o el vector también pueden introducirse en un organismo y generar de esta manera un organismo transgénico. En este caso, dicho organismo presenta la forma de un organismo quimérico, en el que sólo aquellas células que derivan de las células introducidas son transgénicas, es decir, comprenden el polinucleótido heterólogo.

Los organismos no humanos transgénicos preferentemente son organismos productores de aceites, es decir, organismos que se utilizan para la producción de aceites, por ejemplo hongos tales como *Rhizopus* o *Thraustochytrium*, algas tales como *Euglena*, *Nephroselmis*, *Pseudoscurfieldia*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodinium*, *Phaeodactylum*, o diatomeas tales como *Pythium* o *Phytophthora* o plantas

Las plantas transgénicas que pueden utilizarse son, en principio, todas las plantas, es decir, plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Preferentemente presentan la forma de plantas oleaginosas que comprenden grandes cantidades de compuestos lipídicos, tales como cacahuete, colza oleaginosa, colza, girasol, cártamo (*Carthamus tinctoria*), amapola, mostaza, cáñamo, planta del aceite de ricino, oliva, sésamo, *Calendula*, *Punica*, onagra común, *Verbascum*, cardo, rosas silvestres, avellana, almendra, macadamia, aguacate, laurel, calabaza, linaza, soja, pistacho, borraja, árboles (palma aceitera, coco o nogal) o cultivos herbáceos, tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, mandioca, pimienta, tagetes, plantas solanáceas, tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisante, alfalfa o plantas arbustivas (café, cacao, te), especies de *Salix* y hierbas perennes y plantas forrajeras. Son plantas preferentes según la invención plantas de cultivo tales como cacahuete, colza oleaginosa, colza, girasol, cártamo, amapola, mostaza, cáñamo, planta del aceite de ricino, oliva, *Calendula*, *Punica*, onagra común, calabaza, linaza, soja, borraja y árboles (palma aceitera, coco). Resultan especialmente preferentes las plantas ricas en ácidos grasos C18:2 y/o C18:3, tales como girasol, cártamo, tabaco, *Verbascum*, sésamo, algodón, calabaza, amapola, onagra común, nogal, linaza, cáñamo, cardo o cártamo. Son plantas muy especialmente preferentes, cártamo, girasol, amapola, onagra común, linaza o cáñamo. En principio, sin embargo, todas las plantas capaces de sintetizar ácidos grasos resultan adecuados, tales como todas las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, algas o briófitos. Las plantas ventajosas se seleccionan de entre el grupo de las familias de plantas *Adelotheciaceae*, *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Betulaceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Bromeliaceae*, *Caricaceae*, *Cannabaceae*, *Convolvulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cryptocodiniaceae*, *Cucurbitaceae*, *Ditrichaceae*, *Elaeagnaceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Gramineae*, *Juglandaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Linaceae*, *Prasinophyceae* o plantas de hortalizas u ornamentales, tales como tagetes

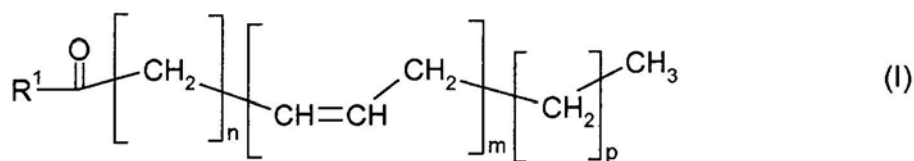
Los ejemplos que pueden mencionarse especialmente preferentemente son las plantas siguientes seleccionadas de entre el grupo que consiste de: *Adelotheciaceae* tales como el género *Physcomitrella*, por ejemplo el género y especie *Physcomitrella patens*, *Anacardiaceae* tales como los géneros *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium*, por ejemplo el género y especie *Pistacia vera* [pistacho], *Mangifera indica* [mango] o *Anacardium occidentale* [anacardo], *Asteraceae*, tales como los géneros *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana*, por ejemplo el género y especie *Calendula officinalis* [caléndula común], *Carthamus tinctorius* [cártamo], *Centaurea cyanus* [aciano], *Cichorium intybus* [achicoria], *Cynara scolymus* [alcachofa], *Helianthus annuus* [girasol], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispera*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta*

communis, *Valeriana locusta* [verduras de ensalada], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* o *Tagetes tenuifolia* [caléndula africana o francesa], *Apiaceae*, tales como el género *Daucus*, por ejemplo el género y especie *Daucus carota* [zanahoria], *Betulaceae*, tales como el género *Corylus*, por ejemplo el género y la especie *Corylus avellana* o *Corylus column* [avellana], *Boraginaceae*, tales como el género *Borago*, por ejemplo el género y especie *Borago officinalis* [borraja], *Brassicaceae*, tales como los géneros *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis*, por ejemplo los géneros y especies *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [colza oleaginosa], *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [mostaza], *Brassica oleracea* [remolacha forrajera] o *Arabidopsis thaliana*, *Bromeliaceae*, tal como los géneros *Anana*, *Bromelia* (piña), por ejemplo los géneros y las especies *Anana comosus*, *Ananas ananas* o *Bromelia comosa* [piña], *Caricaceae*, tales como el género *Carica*, tal como el género y especie *Carica papaya* [papaya], *Cannabaceae*, tal como el género *Cannabis*, tal como el género y especie *Cannabis sativa* [cáñamo], *Convolvulaceae*, tales como los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, por ejemplo los géneros y las especies *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* o *Convolvulus panduratus* [boniato, batata], *Chenopodiaceae*, tales como el género *Beta*, tal como los géneros y especies *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* o *Beta vulgaris* var. *esculenta* [remolacha azucarera], *Cryptocodiniaceae*, tales como el género *Cryptocodinium*, por ejemplo el género y especie *Cryptocodinium cohnii*, *Cucurbitaceae*, tales como el género *Cucurbita*, por ejemplo los géneros y especies *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* o *Cucurbita moschata* [calabaza], *Cymbellaceae*, tales como los géneros *Amphora*, *Cymbella*, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria*, por ejemplo el género y especie *Phaeodactylum tricornutum*, *Ditrichaceae*, tales como los géneros *Ditrichaceae*, *Astomiopsis*, *Ceratodon*, *Chrysoblastella*, *Ditrichum*, *Distichium*, *Eccremidium*, *Lophidion*, *Philibertiella*, *Pleuridium*, *Saelania*, *Trichodon*, *Skottsbergia*, por ejemplo los géneros y especies *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterophyllum*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *stenocarpus*, *Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatisimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichumlineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*, *Pleuridium acuminatum*, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* o *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, *Elaeagnaceae*, tales como el género *Elaeagnus*, por ejemplo el género y especie *Olea europaea* [oliva], *Ericaceae*, tales como el género *Kalmia*, por ejemplo los géneros y especies *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* o *Kalmialucida* [laurel de montaña], *Euphorbiaceae*, tales como los géneros *Manihot*, *Janipha*, *Jatropha*, *Ricinus*, por ejemplo los géneros y especies *Manihot utilisima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [mandioca] o *Ricinus communis* [planta del aceite de ricino], *Fabaceae*, tales como los géneros *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glycine*, *Dolichos*, *Phaseolus*, soja, por ejemplo los géneros y especies *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [guisante], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pseudalbizia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbbeck*, *Acacia macrophylla*, *Albizia lebbbeck*, *Feuillea lebbbeck*, *Mimosa lebbbeck*, *Mimosa speciosa* [árbol de la seda], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [alfalfa] *Glycine max* *Dolichos soja*, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* o *Soja max* [soja], *Funariaceae*, tales como los géneros *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrella*, *Physcomitrium*, por ejemplo los géneros y especies *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica* var. *arctica*, *Funaria hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var. *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonora*, *Funaria sublimbatum*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurytostomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, *Geraniaceae*, tales como los géneros *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum*, por ejemplo los géneros y especies *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* o *Oleum cocois* [coco], *Gramineae*,

tal como el género *Saccharum*, por ejemplo el género y especie *Saccharum officinarum*, Juglandaceae, tales como los géneros *Juglans*, *Wallia*, por ejemplo los géneros y especies *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* o *Wallia nigra* [nogal], Lauraceae, tales como los géneros *Persea*, *Laurus*, por ejemplo los géneros y especies *Laurus nobilis* [laurel], *Persea americana*, *Persea gratissima* o *Persea persea* [aguacate], Leguminosae, tal como el género *Arachis*, por ejemplo el género y especie *Arachis hypogaea* [cacahuete], Linaceae, tales como los géneros *Linum*, *Adenolinum*, por ejemplo los géneros y especies *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* o *Linum trigynum* [linaza], Lythraeae, tal como el género *Punica*, por ejemplo el género y especie *Punica granatum* [granada], Malvaceae, tal como el género *Gossypium*, por ejemplo los géneros y especies *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* o *Gossypium thurberi* [algodón], Marchantiaceae, tal como el género *Marchantia*, por ejemplo los géneros y especies *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae, tal como el género *Musa*, por ejemplo los géneros y especies *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [banana], Onagraceae, tales como los géneros *Camissonia*, *Oenothera*, por ejemplo los géneros y especies *Oenothera biennis* o *Camissonia brevipes* [onagra común], Palmae, tal como el género *Elaeis*, por ejemplo el género y especie *Elaeis guineensis* [palma aceitera], Papaveraceae, tales como el género *Papaver*, por ejemplo los géneros y especies *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [amapola], Pedaliaceae, tal como el género *Sesamum*, por ejemplo el género y especie *Sesamum indicum* [sésamo], Piperaceae, tales como los géneros *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia*, por ejemplo los géneros y especies *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata* [pimienta de cayena], Poaceae, tales como los géneros *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (maíz), *Triticum*, por ejemplo los géneros y especies *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [cebada], *Secale cereale* [centeno], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [avena], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum mil-iacum*, *Panicum militaceum* [mijo], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [arroz], *Zea mays* [maíz] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* o *Triticum vulgare* [wheat], Porphyridiaceae, tales como los géneros *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*, *Vanhoeffenia*, por ejemplo el género y especie *Porphyridium cruentum*, Proteaceae, tal como el género *Macadamia*, por ejemplo el género y especie *Macadamia intergrifolia* [macadamia], Prasinophyceae, tales como los géneros *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, por ejemplo los géneros y especies *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, Rubiaceae, tal como el género *Coffea*, por ejemplo los géneros y especies *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* o *Coffea liberica* [café], Scrophulariaceae, tal como el género *Verbascum*, por ejemplo los géneros y especies *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* o *Verbascum thapsus* [Verbascum], Solanaceae, tales como los géneros *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon*, por ejemplo los géneros y especies *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [pimienta], *Capsicum annuum* [paprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [tabaco], *Solanum tuberosum* [patata], *Solanum melongena* [berenjena], *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum* [tomate], Sterculiaceae, tal como el género *Theobroma*, por ejemplo el género y especie *Theobroma cacao* [cacao] o Theaceae, tal como el género *Camellia*, por ejemplo el género y especie *Camellia sinensis* [te].

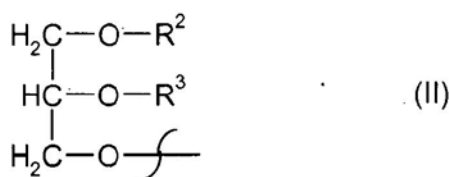
Los microorganismos multicelulares que pueden utilizarse como organismos no humanos transgénicos preferentemente son protistas o diatomeas seleccionadas de entre el grupo de las familias *Dinophyceae*, *Turaniellidae* or *Oxytrichidae*, tal como los géneros y especies: *Crypthecodinium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Stylonychia mytilus*, *Stylonychia pustulata*, *Stylonychia putrina*, *Stylonychia notophora*, *Stylonychia* sp., *Colpidium campylum* o *Colpidium* sp.

La invención se refiere además a un método para la producción de una sustancia que presenta la estructura mostrada en la fórmula general I a continuación:



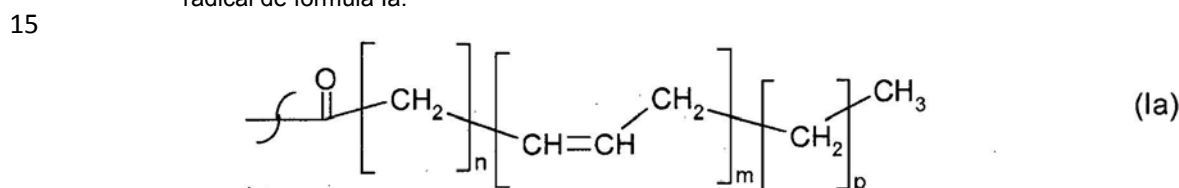
en la que las variables y sustituyentes son los siguientes:

- 5 $R^1 =$ hidroxilo, coenzima A (tioéster), lisofosfatidilcolina, glicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglisofosfatidilinositol, base esfingo o un radical de fórmula II:



- 10 $R^2 =$ hidrógeno, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol o alquil C_2 - C_{24} -carbonilo saturado o insaturado,

$R^3 =$ hidrógeno, alquil C_2 - C_{24} -carbonilo saturado o insaturado, o R^2 y R^3 independientemente uno de otro son un radical de fórmula Ia:

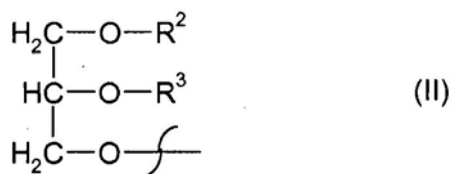


en la que:

$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$ o 9 , $m = 2, 3, 4, 5$ o 6 y $p = 0$ o 3 ,

- 20 y en el que el método comprende el cultivo de: (i) una célula huésped según la invención, o (ii) un organismo no humano transgénico según la invención bajo condiciones que permiten la biosíntesis de la sustancia. Preferentemente, la sustancia anteriormente indicada se proporciona en una cantidad de por lo menos 1% en peso basado en el contenido lipídico total en la célula huésped u organismo transgénico.

- 25 R^1 en la fórmula general I es hidroxilo, coenzima A (tioéster), lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, base esfingo o un radical de la fórmula general II:



- 30 Los radicales anteriormente indicados de R^1 en todos los casos se encuentran unidos a los compuestos de fórmula general I en forma de sus tioésteres.

- 35 R^2 en la fórmula general II es hidrógeno, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol o alquil C_2 - C_{24} -carbonilo saturado o insaturado.

- Los radicales alquilo que pueden mencionarse son cadenas de alquil C_2 - C_{24} -carbonilo saturado o insaturado, sustituidas o no sustituidas, tales como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptil-carbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nona-decilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan preferentes los radicales alquil C_{10} - C_{22} -

carbonilo, tales como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecil-carbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan especialmente preferentes los radicales alquil C₁₀-C₂₂-carbonilo saturados y/o insaturados, tales como alquil C₁₀-carbonilo, alquil C₁₁-carbonilo, alquil C₁₂-carbonilo, alquil C₁₃-carbonilo, alquil C₁₄-carbonilo, alquil C₁₆-carbonilo, alquil C₁₈-carbonilo, alquil C₂₀-carbonilo o alquil C₂₂-carbonilo que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan muy especialmente preferentes los radicales alquil C₁₆-C₂₂-carbonilo saturados o insaturados, tales como alquil C₁₆-carbonilo, alquil C₁₈-carbonilo, alquil C₂₀-carbonilo o alquil C₂₂-carbonilo que comprenden uno o más dobles enlaces. Estos radicales ventajosos pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Los radicales especialmente ventajosos con 20 o 22 átomos de carbono en la cadena del ácido graso comprenden hasta seis dobles enlaces, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces, especialmente preferente cinco o seis dobles enlaces. La totalidad de los radicales anteriormente indicados se deriva de los ácidos grasos correspondientes.

R³ en la fórmula general II es hidrógeno, alquil C₂-C₂₄-carbonilo saturado o insaturado.

Los radicales alquilo que pueden mencionarse son cadenas de alquil C₂-C₂₄-carbonilo saturado o insaturado, sustituidas o no sustituidas, tales como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptil-carbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nona-decilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan preferentes los radicales alquil C₁₀-C₂₂-carbonilo, tales como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecil-carbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan especialmente preferentes los radicales alquil C₁₀-C₂₂-carbonilo saturados y/o insaturados, tales como alquil C₁₀-carbonilo, alquil C₁₁-carbonilo, alquil C₁₂-carbonilo, alquil C₁₃-carbonilo, alquil C₁₄-carbonilo, alquil C₁₆-carbonilo, alquil C₁₈-carbonilo, alquil C₂₀-carbonilo o alquil C₂₂-carbonilo que comprenden uno o más dobles enlaces. Resultan muy especialmente preferentes los radicales alquil C₁₆-C₂₂-carbonilo saturados o insaturados, tales como alquil C₁₆-carbonilo, alquil C₁₈-carbonilo, alquil C₂₀-carbonilo o alquil C₂₂-carbonilo que comprenden uno o más dobles enlaces. Estos radicales ventajosos pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Los radicales especialmente ventajosos con 20 o 22 átomos de carbono en la cadena del ácido graso comprenden hasta seis dobles enlaces, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces, especialmente preferente cinco o seis dobles enlaces. La totalidad de los radicales anteriormente indicados se deriva de los ácidos grasos correspondientes.

Los radicales anteriormente indicados de R¹, R² y R³ pueden sustituirse con grupos hidroxilo y/o epoxi y/o pueden comprender triples enlaces.

Los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el método según la invención comprenden ventajosamente por lo menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Los ácidos grasos especialmente ventajosamente comprenden cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Los ácidos grasos producidos en el método ventajosamente presentan 18, 20 o 22 átomos de C en la cadena del ácido graso; los ácidos grasos preferentemente comprenden 20 o 22 átomos de carbono en la cadena del ácido graso. Los ácidos grasos saturados se hacen reaccionar ventajosamente en un grado menor, o nada en absoluto, con los ácidos nucleicos utilizados en el método. En un grado menor debe entenderse como refiriéndose a que los ácidos grasos saturados se hacen reaccionar con menos de 5% de la actividad, ventajosamente menos de 3%, especialmente ventajosamente con menos de 2%, muy especialmente preferentemente con menos de 1, 0,5, 0,25 o 0,125% en comparación con los ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos que han sido producidos pueden producirse en el método como producto individual o pueden encontrarse presentes en una mezcla de ácidos grasos.

Ventajosamente, los sustituyentes R² o R³ en las fórmulas generales I y II son, independientemente uno de otro, alquil C₁₈-C₂₂-carbonilo saturado o insaturado, especialmente ventajosamente son, independientemente uno de otro, alquil C₁₈, C₂₀ o C₂₂-carbonilo insaturado con por lo menos dos dobles enlaces.

Los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el método se encuentran ventajosamente unidos en lípidos de membrana y/o triacilglicéridos, aunque también pueden encontrarse en los organismos en forma de ácidos grasos libres o unidos en forma de otros ésteres de ácido graso. En el presente contexto, pueden encontrarse presentes como "productos puros" o ventajosamente en forma de mezclas de diversos ácidos grasos o mezclas de diferentes glicéridos. Los diversos ácidos grasos que se encuentran unidos en los triacilglicéridos pueden derivarse de ácidos grasos de cadena corta con 4 a 6 átomos de C, ácidos grasos de cadena intermedia con 8 a 12 átomos de C o ácidos grasos de cadena larga con 14 a 24 átomos de C; resultan preferentes los ácidos grasos de cadena larga, más preferentemente los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con 18, 20 y/o 22 átomos de C.

El método según la invención ventajosamente rinde ésteres de ácido graso con moléculas de ácido graso poliinsaturado C₁₈, C₂₀ y/o C₂₂ con por lo menos dos dobles enlaces en el éster de ácido graso, ventajosamente con por lo menos tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces en el éster de ácido graso, especialmente ventajosamente con por lo menos cinco o seis dobles enlaces en el éster de ácido graso y ventajosamente conduce a la síntesis de ácido linoleico (=LA, C18:2^{Δ9,12}), ácido γ-linolénico (= GLA, C18:3^{Δ6,9,12}), ácido estearidónico (= SDA, C18:4^{Δ6,9,12,15}), ácido dihomo-γ-linolénico (= DGLA, 20:3^{Δ8,11,14}), ácido ω3-eicosatetraenoico (= ETA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), ácido araquidónico (ARA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5^{Δ5,8,11,14,17}), ácido ω6-docosapentaenoico (C22:5^{Δ4,7,10,13,16}), ácido ω6-docosatetraenoico (C22:4^{Δ7,10,13,16}), ácido ω3-docosapentaenoico (= DPA, C22:5^{Δ7,10,13,16,19}), ácido docosahexaenoico (= DHA, C22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}) o mezclas de los mismos, preferentemente ARA, EPA y/o DHA. Se producen muy especialmente preferente ácidos grasos ω3, tales como EPA y/o DHA.

Los ésteres de ácido graso con moléculas de ácido graso poliinsaturado C₁₈, C₂₀ y/o C₂₂ pueden aislarse en forma de un aceite o lipido, por ejemplo en forma de compuestos tales como esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos tales como glicoesfingolípidos, fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos u otros ésteres de ácido graso tales como ésteres de acetil-coenzima A que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados con por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis, preferentemente cinco o seis dobles enlaces, de los organismos que han sido utilizados para la preparación de los ésteres de ácidos grasos; ventajosamente se aíslan en forma de sus diacilglicéridos, triacilglicéridos y/o en forma de fosfatidilcolina, especialmente preferentemente en forma de los triacilglicéridos. Además de estos ésteres, los ácidos grasos poliinsaturados también se encuentran presentes en los organismos, ventajosamente las plantas, en forma de ácidos grasos libres o unidos en otros compuestos. Como regla general, los diversos compuestos anteriormente indicados (ésteres de ácido graso y ácidos grasos libres) se encuentran presentes en los organismos con una distribución aproximada de 80% a 90% en peso de triglicéridos, 2% a 5% en peso de diglicéridos, 5% a 10% en peso de monoglicéridos, 1% a 5% en peso de ácidos grasos libres, 2% a 8% en peso de fosfolípidos, alcanzando el total de los diversos compuestos 100% en peso.

El método según la invención rinde los LCPUFA producidos en un contenido de por lo menos 3% en peso, ventajosamente por lo menos 5% en peso, preferentemente por lo menos 8% en peso, especialmente preferentemente por lo menos 10% en peso, más preferentemente por lo menos 15% en peso, basado en los ácidos grasos totales en los organismos transgénicos, ventajosamente en una planta transgénica. En el presente contexto, resulta ventajoso convertir los ácidos grasos C₁₈ y/o C₂₀ que se encuentran presentes en los organismos huésped en por lo menos 10%, ventajosamente en por lo menos 20%, especialmente ventajosamente en por lo menos 30%, más ventajosamente en por lo menos 40%, proporcionando los productos correspondientes, tales como DPA o DHA, por mencionar sólo dos ejemplos. Los ácidos grasos se producen ventajosamente en forma unida. Estos ácidos grasos insaturados pueden, con ayuda de los ácidos nucleicos utilizados en el método según la invención, posicionarse en la posición sn1, sn2 y/o sn3 de los triglicéridos producidos ventajosamente. Debido a que se lleva a cabo una pluralidad de etapas de reacción con los compuestos iniciales ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3) en el método según la invención, los productos finales del método, tales como, por ejemplo, ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido ω6-docosapentaenoico o DHA, no se obtienen en forma de productos absolutamente puros; en todos los casos se encuentran trazas menores de los precursores en el producto final. En el caso de que, por ejemplo, se encuentren presentes tanto el ácido linoleico como el ácido linolénico, en el organismo inicial y en la planta inicial, los productos finales, tales como ARA, EPA o DHA, se encontrarán presentes en forma de mezclas. Los precursores ventajosamente no deben suponer más de 20% en peso, preferentemente no más de 15% en peso, especialmente preferentemente no más de 10% en peso, más preferentemente no más de 5% en peso, basado en la cantidad del producto final en cuestión. Ventajosamente sólo se producen ARA, EPA o sólo DHA, unidos o como ácidos libres, a modo de productos finales en una planta transgénica en el método según la invención. En el caso de que los compuestos ARA, EPA y DHA se produzcan simultáneamente, se producen ventajosamente en una proporción de por lo menos 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), ventajosamente de por lo menos 1:1:3, preferentemente de 1:1:4, especialmente preferentemente de 1:1:5.

Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos mediante el método según la invención ventajosamente comprenden 6% a 15% de ácido palmítico, 1% a 6% de ácido esteárico, 7% a 85% de ácido oleico, 0,5% a 8% de ácido vaccénico, 0,1% a 1% de ácido aráquico, 7% a 25% de ácidos grasos saturados, 8% a 85% de ácidos grasos monoinsaturados y 60% a 85% de ácidos grasos poliinsaturados, en cada caso basados en 100% y en el contenido de ácidos grasos totales de los organismos. Los ácidos grasos poliinsaturados ventajosos que se encuentran presentes en los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos preferentemente son por lo menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1% de ácido araquidónico, basado en el contenido de ácidos grasos totales. Además, los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos que se han producido mediante el método de la invención ventajosamente comprenden ácidos grasos seleccionados de entre el grupo de los ácidos grasos ácido erúrico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilenoctadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilenheptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopentenododecanoico), ácido graso furano (ácido 9,12-

epoxioctadeca-9,11-dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarínico (ácido 6-octadecinoico), ácido 6-nondecinoico, ácido santálico (ácido t11-octadecén-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido t10-heptadecén-8-inoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecén-12-inoico), ácido 13,14-dihidroorofeico, ácido octa-decén-13-en-9,11-diinoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12-octadecatrienoico), ácido punílico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido *all-cis*-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioleico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c,11t-octadecadienoico). Los ácidos grasos anteriormente indicados ventajosamente se encuentran, como regla general, únicamente en cantidades traza en los ésteres de ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos producidos mediante el método según la invención, es decir, basándose en los ácidos grasos totales, se encuentran en cantidades inferiores a 30%, preferentemente inferiores a 25%, 24%, 23%, 22% o 21%, especialmente preferentemente inferiores a 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6% o 5%, muy especialmente preferentemente inferiores a 4%, 3%, 2% o 1%. Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos mediante el método según la invención ventajosamente comprenden menos de 0,1%, basado en los ácidos grasos totales, o nada de ácido butírico, nada de colesterol, nada de ácido clupanodónico (=ácido docosapentaenoico, C22:5^{Δ48,12,11,21}) y nada de ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}). Gracias a las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, o las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en el método según la invención, puede obtenerse un incremento del rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados de por lo menos 50%, ventajosamente de por lo menos 80%, especialmente ventajosamente de por lo menos 100%, muy especialmente ventajosamente de por lo menos 150%, en comparación con el organismo inicial no transgénico, por ejemplo una levadura, un alga, un hongo o una planta tal como *Arabidopsis* o linaza, en una comparación mediante análisis de CG.

También pueden prepararse ácidos grasos poliinsaturados químicamente puros o composiciones de ácidos grasos mediante los métodos descritos anteriormente. Con este fin, se aíslan los ácidos grasos o las composiciones de ácidos grasos a partir del organismo, tal como los microorganismos o las plantas o el medio de cultivo en o sobre el que han crecido los organismos, o del organismo y del medio de cultivo, de una manera conocida, por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, cromatografía o combinaciones de estos métodos. Estos ácidos grasos químicamente puros o composiciones de ácidos grasos resultan ventajosos para aplicaciones en la industria alimentaria, la industria cosmética y especialmente la industria farmacéutica.

En principio, todos los genes del metabolismo de los ácidos grasos o los lípidos pueden ser utilizados en el método para la producción de ácidos grasos poliinsaturados, ventajosamente en combinación con el polinucleótido o polinucleótidos de la invención (para los fines de la presente solicitud, se entiende que el plural comprende el singular y viceversa). Los genes del metabolismo de los ácidos grasos o los lípidos que se utilizan se seleccionan ventajosamente de entre el grupo que consiste de la acil-CoA deshidrogenasa(s), acil-ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa(s), acil-ACP tioesterasa(s), ácido graso aciltransferasa(s), acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasas, ácido graso sintasa(s), ácido graso hidroxilasa(s), acetil-coenzima A carboxilasa(s), acilcoenzima A oxidasa(s), ácido graso desaturasa(s), ácido graso acetiltransferasa(s), lipoxigenasas, triacilglicerol lipasas, alenóxido sintasas, hidroperóxido liasas o ácido graso elongasa(s). Preferentemente se utilizan genes seleccionados de entre el grupo de las Δ4-desaturasas, Δ5-desaturasas, Δ6-desaturasas, Δ8-desaturasas, Δ9-desaturasas, Δ12-desaturasas, Δ15-desaturasas, Δ12- y Δ15-desaturasas, ω3-desaturasas, Δ6-elongasas, Δ9-elongasas o Δ5-elongasas en combinación con los polinucleótidos según la invención, resultando posible utilizar genes individuales o una pluralidad de genes en combinación. Para combinaciones génicas especialmente preferentes se hace referencia en la presente memoria a las Tablas 5 y 6, las cuales se muestran en los ejemplos.

Ventajosamente, las desaturasas utilizadas en el método según la invención convierten sus sustratos respectivos en la forma de los ésteres del ácido graso-CoA. En caso de estar precedidas por una etapa de elongación, ello resulta ventajosamente en un rendimiento de producto incrementado. De esta manera, los productos de desaturación respectivos se sintetizan en cantidades mayores, ya que la etapa de elongación habitualmente se lleva a cabo con los ésteres de ácido graso-CoA, mientras que la etapa de desaturación se lleva a cabo predominantemente con los fosfolípidos o los triglicéridos. Por lo tanto, no resulta necesaria una reacción de sustitución entre los ésteres de ácido graso-CoA y los fosfolípidos o triglicéridos, lo que requeriría una reacción enzimática adicional, posiblemente limitante.

Debido a la actividad enzimática de los polipéptidos utilizados en el método según la invención, puede producirse un amplio abanico de ácidos grasos poliinsaturados en el método según la invención. Dependiendo de la elección de los organismos, tales como las plantas ventajosas, utilizados para el método según la invención, pueden producirse mezclas de los diversos ácidos grasos poliinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados individuales, tales como EPA o AR, en forma libre o ligada. Según la composición de ácidos grasos predominante en la planta inicial (ácidos grasos C18:2 o C18:3), se obtienen de esta manera los ácidos grasos que se derivan de los ácidos grasos C18:2, tales como GLA, DGLA o ARA, o los ácidos grasos que se derivan de los ácidos grasos C18:3, tales como SDA,

ETA o EPA. En caso de que sólo se halle presente el ácido linoleico (= LA, C18:2^{Δ9,12}) como ácido graso insaturado en la planta utilizada para el método, el método sólo puede proporcionar GLA, DGLA y ARA como productos, la totalidad de los cuales puede encontrarse presente como ácidos grasos libres o en forma ligada. En caso de que sólo se halle presente el ácido α-linolénico (=ALA, C18:3^{Δ9,12,15}) como ácido graso insaturado en la planta utilizada para el método, el método sólo puede proporcionar SDA, ETA, EPA y/o DHA como productos, la totalidad de los cuales puede encontrarse presente como ácidos grasos libres o en forma ligada, tal como se ha indicado anteriormente. Debido a la modificación de la actividad de las enzimas Δ5-desaturasa, Δ6-desaturasa, Δ4-desaturasa, Δ12-desaturasa, Δ15-desaturasa, ω3-desaturasa, Δ5-elongasa y/o Δ6-elongasa, que desempeñan un papel en la síntesis, resulta posible producir, de una manera dirigida, sólo los productos individuales en los organismos anteriormente indicados, ventajosamente en las plantas anteriormente indicadas. Debido a la actividad de la Δ6-desaturasa y Δ6-elongasa, se forman por ejemplo GLA y DGLA, o SDA y ETA, según la planta inicial y el ácido graso insaturado. Preferentemente se forman DGLA o ETA o mezclas de los mismos. En el caso de que se introduzcan adicionalmente en los organismos, ventajosamente en la planta, Δ5-desaturasa, Δ5-elongasa y Δ4-desaturasa, se forman adicionalmente ARA, EPA y/o DHA. Ventajosamente se sintetizan únicamente ARA, EPA o DHA o mezclas de los mismos, según los ácidos grasos presentes en el organismo, o en la planta, que actúan como sustancia inicial para la síntesis. Debido a que se producen cascadas biosintéticas, los productos finales en cuestión no se encuentran presentes como sustancias puras en los organismos. En todo caso se encuentran adicionalmente presentes en el producto final cantidades pequeñas de los compuestos precursores. Estas cantidades pequeñas constituyen menos de 20% en peso, ventajosamente menos de 15% en peso, especialmente ventajosamente menos de 10% en peso, más ventajosamente menos de 5, 4, 3, 2 o 1% en peso, basado en el producto final DGLA, ETA o sus mezclas, o ARA, EPA, DHA o sus mezclas, ventajosamente EPA o DHA o sus mezclas.

Además de la producción, directamente en el organismo, de los ácidos grasos iniciales para los polipéptidos utilizados en el método de la invención, los ácidos grasos también pueden alimentarse externamente. La producción en el organismo resulta preferente por economía. Los sustratos preferentes son el ácido linoleico (C18:2^{Δ9,12}), el ácido γ-linolénico (C18:3^{Δ6,9,12}), el ácido eicosadienoico (C20:2^{Δ11,14}), el ácido dihomo-γ-linolénico (C20:3^{Δ8,11,14}), el ácido araquidónico (C20:4^{Δ5,8,11,14}), el ácido docosatetraenoico (C22:4^{Δ7,10,13,16}) y el ácido docosapentaenoico (C22:5^{Δ4,7,10,13,15}).

Para incrementar el rendimiento en el método descrito para la producción de aceites y/o triglicéridos con un contenido ventajosamente elevado de ácidos grasos poliinsaturados, resulta ventajoso incrementar la cantidad de producto inicial para la síntesis de los ácidos grasos; ello puede conseguirse por ejemplo mediante la introducción, en el organismo, de un ácido nucleico que codifique para un polipéptido con una actividad de Δ5-desaturasa según la invención. Lo anterior resulta particularmente ventajoso en organismos productores de aceites tales como los de la familia de las *Brassicaceae*, tales como el género *Brassica*, por ejemplo la colza oleaginosa; la familia de las *Elaeagnaceae*, tales como el género *Elaeagnus*, por ejemplo el género y especie *Olea europaea*; o la familia *Fabaceae*, tal como el género *Glycine*, por ejemplo el género y especie *Glycine max*, que presentan un alto contenido en ácido oleico. Debido a que estos organismos sólo presentan un contenido bajo de ácido linoleico (Mikolajczak *et al.*, Journal of the American Oil Chemical Society 38:678-681, 1961), resulta ventajosa la utilización de las Δ5-desaturasas para producir el ácido araquidónico inicial, o el ácido eicosapentaenoico, o ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico.

El método según la invención utiliza ventajosamente las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente indicadas o sus derivados u homólogos que codifican para polipéptidos que conservan la actividad enzimática de las proteínas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos. Estas secuencias, individualmente o en combinación con los polinucleótidos según la invención, se clonan en constructos de expresión y se utilizan para la introducción y expresión en organismos. Debido a su construcción, estos constructos de expresión permiten una síntesis óptima ventajosa de los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el método según la invención.

En una realización preferente, el método comprende además la etapa de obtener una célula o un organismo intacto que comprende las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en el método, en el que la célula y/o el organismo se transforma con un polinucleótido según la invención, un constructo génico o un vector tal como se indica posteriormente, solo o en combinación con secuencias de ácidos nucleicos adicionales que codifican para las proteínas del metabolismo de ácidos grasos o lípidos. En una realización preferente adicional, dicho método comprende además la etapa de obtener los aceites, lípidos o ácidos grasos libres a partir del organismo o a partir del cultivo. El cultivo puede, por ejemplo, adoptar la forma de un cultivo de fermentación, por ejemplo en el caso del cultivo de microorganismos, tales como, por ejemplo, *Mortierella*, *Thalassiosira*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Saccharomyces* o *Thraustochytrium*, o un cultivo de invernadero o de campo de una planta. La célula o el organismo producido de esta manera ventajosamente es una célula de un organismo productor de aceite, tal como un cultivo oleaginoso, tal como, por ejemplo, cacahuete, colza oleaginosa, colza, linaza, cáñamo, soja, cártamo, girasol o borraja.

En el caso de las células vegetales, tejidos vegetales u órganos vegetales, "cultivo" se entiende como referido a, por ejemplo, cultivar sobre o en un medio nutritivo, o de la planta intacta sobre o en un sustrato, por ejemplo en un cultivo hidropónico, sustrato (compost) de crecimiento o una tierra cultivable.

- 5 Los organismos o células huésped adecuados para el método según la invención son aquellas que son capaces de sintetizar ácidos grasos, concretamente ácidos grasos insaturados y/o que resultan adecuados para la expresión de genes recombinantes. Son ejemplos que pueden mencionarse, plantas tales como *Arabidopsis*, *Asteraceae* tales como caléndula o plantas de cultivo, tales como soja, cacahuete, planta del aceite de ricino, girasol, maíz, algodón, lino, colza oleaginosa, coco, palma de aceite, cártamo (*Carthamus tinctorius*) o semilla del cacao; microorganismos, 10 tales como hongos, por ejemplo de los géneros *Mortierella*, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia*, *Phytophthora* o *Pythium*; bacterias, tales como de los géneros *Escherichia* o *Shewanella*; levaduras, tales como de los géneros *Saccharomyces*; cianobacterias, ciliados; algas, tales como *Mantoniella* u *Ostreococcus*, o protozoos, tales como dinoflagelados, tales como *Thalassiosira* o *Cryptocodinium*. Son organismos preferentes aquellos que son capaces naturalmente de sintetizar cantidades sustanciales de aceites, tales como hongos, tales como *Mortierella alpina*, 15 *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans*, o plantas tales como soja, colza oleaginosa, coco, palma de aceite, cártamo, lino, cáñamo, planta del aceite de ricino, caléndula, cacahuete, semilla del cacao o girasol, o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, resultan especialmente preferentes soja, lino, colza oleaginosa, cártamo, girasol, caléndula, *Mortierella* o *Saccharomyces cerevisiae*. En principio son adecuados como organismos huésped, además de los organismos transgénicos anteriormente indicados, también animales transgénicos, ventajosamente animales no humanos, por ejemplo *Caenorhabditis elegans*. Ya se han descrito extensamente antes células y 20 organismos huésped adecuados adicionales.

- Pueden ventajosamente comercializarse directamente plantas transgénicas que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados sintetizados en el método según la invención sin necesidad de aislar los aceites, lípidos o ácidos grasos sintetizados. Las plantas para el método según la invención se listan como refiriéndose a plantas intactas y 25 todas las partes de plantas, órganos de plantas o partes de plantas tales como hojas, tallos, semillas, raíces, tubérculos, estambres, fibras, raíces capilares, tallos, embriones, callos, cotiledones, pecíolos, material recolectado, tejido vegetal, tejido reproductivo y cultivos celulares derivados de la planta transgénica misma y/o que pueden utilizarse para generar la planta transgénica.. En el presente contexto, la semilla comprende todas las partes de la semilla, tales como las cubiertas de la semilla, células epidérmicas, células germinales, endosperma o tejido embrionario. Sin embargo, los compuestos producidos en el método según la invención también pueden aislarse a partir de los organismos, ventajosamente plantas, en forma de sus aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados producidos mediante el presente método pueden obtenerse mediante recolección de los organismos, del cultivo en que crecen, o del campo. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante prensado o 35 extracción de las partes de plantas, preferentemente de las semillas de las plantas. En el presente contexto, los aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres pueden obtenerse mediante prensado mediante lo que se conoce como prensado en frío, sin aplicación de calor. Para conseguir una más fácil rotura de las partes de las plantas, concretamente las semillas, previamente se trituran, vaporizan o tuestan. Las semillas que han sido pretratadas de esta manera seguidamente pueden prensarse o extraerse con solvente, tal como hexano caliente. Posteriormente se elimina el solvente. En el caso de los microorganismos, estos son, después de la recolección, por ejemplo extraídos directamente sin etapas de método adicionales o, alternativamente, después de la rotura, extraídos mediante diversos métodos que resultarán familiares al experto en la materia. De esta manera, puede aislarse más de 96% de los compuestos producidos en el método. A continuación, los productos resultantes siguen etapas adicionales, es decir, se refinan. En este método, en primer lugar se eliminan por ejemplo los mucilagos de la planta y la materia 45 suspendida. Lo que se conoce como deslamado puede llevarse a cabo enzimáticamente o, por ejemplo, físicoquímicamente mediante la adición de ácido, tal como ácido fosfórico. A continuación, se separan los ácidos grasos libres mediante tratamiento con una base, por ejemplo solución de hidróxido sódico. El producto resultante se lava exhaustivamente con agua para eliminar el álcali remanente en el producto y después se seca. Para eliminar los pigmentos que queden en el producto, los productos se someten a blanqueamiento, por ejemplo utilizando greda o carbón activo. Al final el producto de desodoriza, por ejemplo utilizando vapor. 50

- Los PUFA o LCPUFA producidos mediante este método preferentemente son moléculas de ácido graso C₁₈, C₂₀ o C₂₂, ventajosamente moléculas de ácido graso C₂₀ o C₂₂, con por lo menos dos dobles enlaces en la molécula de ácido graso, preferentemente tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Estas moléculas de ácido graso C₁₈, C₂₀ o 55 C₂₂ pueden aislarse del organismo en forma de un aceite, un lípido o un ácido graso libre. Los organismos adecuados son, por ejemplo, los indicados anteriormente. Los organismos preferentes son las plantas transgénicas.

- Se describen aceites, lípidos o ácidos grasos o fracciones de los mismos, que han sido producidos mediante el método anteriormente descrito, especialmente preferentemente aceite, lípido o una composición de ácidos grasos 60 que comprende PUFA y que se ha derivado de plantas transgénicas. Tal como se ha indicado anteriormente estos aceites, lípidos o ácidos grasos ventajosamente comprenden 6% a 15% de ácido palmítico, 1% a 6% de ácido esteárico, 7% a 85% de ácido oleico, 0,5% a 8% de ácido vaccénico, 0,1% a 1% de ácido aráquico, 7% a 25% de ácidos grasos saturados, 8% a 85% de ácidos grasos monoinsaturados y 60% a 85% de ácidos grasos

poliinsaturados, en cada caso basados en 100% y en el contenido de ácidos grasos totales de los organismos. Los ácidos grasos poliinsaturados ventajosos que se encuentran presentes en los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos preferentemente son por lo menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1% de ácido araquidónico, basado en el contenido de ácidos grasos totales. Además, los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos que se han producido mediante el método de la invención ventajosamente comprenden ácidos grasos seleccionados de entre el grupo de los ácidos grasos ácido erúrico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilenoctadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilenheptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopentenododecanoico), ácido graso furano (ácido 9,12-epoxioctadeca-9,11-dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarínico (ácido 6-octadecenoico), ácido 6-nondecenoico, ácido santálico (ácido t11-octadecén-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido t10-heptadecén-8-inoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecén-12-inoico), ácido 13,14-dihidroorfeico, ácido octa-decén-13-en-9,11-diinoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12-octadecatrienoico), ácido punílico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido *all-cis*-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c,11t-octadecadienoico). Los ácidos grasos anteriormente indicados ventajosamente se encuentran, como regla general, únicamente en cantidades traza en los ésteres de ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos producidos mediante el método según la invención, es decir, basándose en los ácidos grasos totales, se encuentran en cantidades inferiores a 30%, preferentemente inferiores a 25%, 24%, 23%, 22% o 21%, especialmente preferentemente inferiores a 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6% o 5%, muy especialmente preferentemente inferiores a 4%, 3%, 2% o 1%. Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos mediante el método según la invención ventajosamente comprenden menos de 0,1%, basado en los ácidos grasos totales, o nada de ácido butírico, nada de colesterol, nada de ácido clupanodónico (=ácido docosapentaenoico, C22:5^{Δ4,8,12,11,21}) y nada de ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}).

Los aceites, lípidos o ácidos grasos preferentemente comprenden por lo menos 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% o 5%, ventajosamente por lo menos 6%, 7%, 8%, 9% o 10%, especialmente ventajosamente por lo menos 11%, 12%, 13%, 14% o 15% de ARA o por lo menos 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% o 5%, ventajosamente por lo menos 6% o 7%, especialmente ventajosamente por lo menos 8%, 9% o 10% de EPA y/o DHA, basado en el contenido de ácidos grasos totales del organismo de producción, ventajosamente de una planta, especialmente ventajosamente de una planta de cultivo oleaginoso, tal como soja, colza oleaginosa, coco, palma de aceite, cártamo, lino, cáñamo, planta del aceite de ricino, caléndula, cacahuete, semilla del cacao, girasol o las plantas de cultivo oleaginoso mono- o di-cotiledóneas adicionales anteriormente indicadas.

Se describe además la utilización del aceite, lípido, los ácidos grasos y/o la composición de ácidos grasos en piensos, alimentos, cosméticos o farmacéuticos. Los aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos pueden utilizarse de la manera que resulte familiar para el experto en la materia para la mezcla con otros aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de origen animal, tales como, por ejemplo, aceites de pescado. Estos aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos, que están compuestos de constituyentes vegetales y animales, también pueden utilizarse para la preparación de piensos, alimentos, cosméticos o farmacéuticos.

El término "aceite", "lípido" o "grasa" se entiende que se refiere a una mezcla de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos insaturados, saturados, preferentemente esterificados. El aceite, lípido o grasa preferentemente es rico en uno o más ácidos grasos poliinsaturados libres o, ventajosamente, esterificados, en particular ácido linoleico, ácido γ-linolénico, ácido dihomo-γ-linolénico, ácido araquidónico, ácido α-linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico. La cantidad de ácidos grasos esterificados insaturados preferentemente constituye aproximadamente 30%, un contenido de 50% resulta más preferente, un contenido de 60%, 70%, 80% o superior resulta todavía más preferente. Para el análisis, el contenido de ácidos grasos puede determinarse mediante, por ejemplo, cromatografía de gases tras la conversión de los ácidos grasos en los metil-ésteres mediante transesterificación. El aceite, lípido o grasa puede comprender diversos otros ácidos grasos saturados o insaturados, por ejemplo ácido calendúlico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico y similares. El contenido de los diversos ácidos grasos en el aceite o grasa puede variar, en particular según el organismo inicial.

Los ácidos grasos poliinsaturados con ventajosamente por lo menos dos dobles enlaces que se producen en el método son, tal como se ha indicado anteriormente, por ejemplo esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, monoacilglicerol, diacilglicerol, triacilglicerol u otros ésteres de ácido graso.

Partiendo de los ácidos grasos poliinsaturados con ventajosamente por lo menos cinco o seis dobles enlaces, los cuales han sido preparados mediante el método según la invención, los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran presentes pueden liberarse mediante, por ejemplo, el tratamiento con álcali, por ejemplo KOH o NaOH

acuoso, o hidrólisis ácida, ventajosamente en presencia de un alcohol tal como metanol o etanol, o mediante corte enzimático, y aislarse mediante, por ejemplo, separación de fases y posterior acidificación con, por ejemplo, H_2SO_4 . Los ácidos grasos también pueden liberarse directamente sin la etapa del método anteriormente descrita.

Tras su introducción en un organismo, ventajosamente una célula vegetal o planta, los ácidos nucleicos utilizados en el método pueden encontrarse presentes en un plásmido separado o, ventajosamente, integrados en el genoma de la célula huésped. En el caso de la integración en el genoma, la integración puede ser aleatoria o alternativamente llevarse a cabo mediante recombinación de manera que el gen nativo es sustituido por la copia introducida, de manera que la producción del compuesto deseado por la célula se encuentra modulado, o mediante la utilización de un gen "en trans", de manera que el gen se encuentra ligado operablemente con una unidad de expresión funcional que comprende por lo menos una secuencia que garantiza la expresión de un gen y por lo menos una secuencia que garantiza la poliadenilación de un gen transcrito funcionalmente. Los ácidos nucleicos se introducen ventajosamente en los organismos mediante casetes o constructos multiexpresión para la expresión multiparalela, ventajosamente en las plantas para la expresión específica de semilla multiparalela de los genes.

Los briófitos y algas son los únicos sistemas vegetales conocidos que producen cantidades sustanciales de ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido araquidónico (ARA) y/o ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). Los briófitos comprenden PUFA en los lípidos membranales, mientras que las algas, organismos relacionados con las algas y unos cuantos hongos, también acumulan cantidades sustanciales de PUFA en la fracción triacilglicerol. Por ello las moléculas de ácidos nucleicos que se aíslan de dichas cepas que también acumulan PUFA en la fracción triacilglicerol resultan particularmente ventajosas para el método según la invención y de esta manera para la modificación del sistema de producción de lípidos y PUFA en un huésped, en particular de plantas tales como cultivos oleaginosos, por ejemplo colza oleaginosa, colza, linaza, cáñamo, soja, girasol y borraja. Por lo tanto, pueden utilizarse ventajosamente en el método según la invención.

Los sustratos que resultan adecuados para los polipéptidos según la invención del metabolismo de ácidos grasos o lípidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la acil-CoA deshidrogenasa(s), acil-ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa(s), acil-ACP tioesterasa(s), ácido graso aciltransferasa(s), acil-CoA:lisofofolípido aciltransferasas, ácido graso sintasa(s), ácido graso hidroxilasa(s), acetil-coenzima A carboxilasa(s), acilcoenzima A oxidasa(s), ácido graso desaturasa(s), ácido graso acetiltransferasa(s), lipoxigenasas, triacilglicerol lipasas, alenóxido sintasas, hidroperóxido liasas o ácido graso elongasa(s) ventajosamente son ácidos grasos C_{16} , C_{18} o C_{20} . Los ácidos grasos convertidos en sustratos en el método preferentemente se convierten en la forma de sus ésteres de acil-CoA y/o en sus ésteres de fosfolípido.

Con el fin de producir los PUFA de cadena larga según el método de la invención, los ácidos grasos C_{18} poliinsaturados deben en primer lugar desaturarse con la actividad enzimática de una desaturasa y posteriormente elongarse en por lo menos dos átomos de carbono con una elongasa. Tras un ciclo de elongación, dicha actividad enzimática proporciona ácidos grasos C_{20} y tras dos ciclos de elongación, ácidos grasos C_{22} . La actividad de las desaturasas y elongasas utilizadas en el método según la invención preferentemente conduce a ácidos grasos C_{18} , C_{20} y/o C_{22} , ventajosamente con por lo menos dos dobles enlaces en la molécula del ácido graso, preferentemente con tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces, especialmente preferentemente proporcionando ácidos grasos C_{20} y/o C_{22} con por lo menos dos dobles enlaces en la molécula del ácido graso, preferentemente con tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces, muy especialmente preferentemente con cinco o seis dobles enlaces en la molécula. Tras una primera desaturación y la elongación, pueden producirse etapas adicionales de desaturación y elongación, tales como, por ejemplo, una desaturación en las posiciones $\Delta 5$ y $\Delta 4$. Los productos del método según la invención que resultan especialmente preferentes son el ácido dihomo- γ -linolénico, el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosapentaenoico y/o el ácido docosahexaenoico. Los ácidos grasos C_{20} con por lo menos dos dobles enlaces en el ácido graso pueden desaturarse con la actividad enzimática según la invención en forma del ácido graso libre o en forma de los ésteres, tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, monoacilglicerol, diacilglicerol o triacilglicerol.

El sitio de biosíntesis preferente de los ácidos grasos, aceites, lípidos o grasas en las plantas que se utilizan ventajosamente es, por ejemplo, en general los estratos germinales o celulares de la semilla, de manera que tiene sentido la expresión específica de semilla de los ácidos nucleicos utilizada en el método. Sin embargo, resulta evidente que la biosíntesis de ácidos grasos, aceites o lípidos no es necesario que esté limitada al tejido germinal, sino que también puede tener lugar de una manera específica de tejido en todas las demás partes de la planta, por ejemplo en células epidérmicas o en los tubérculos.

En el caso de que se utilice un microorganismo, tal como levaduras tales como *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*; hongos tales como *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* o *Thraustochytrium*; algas tales como *Isochrysis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Phaeodactylum* o *Cryptocodinium*, en el método según la invención, estos organismos se cultivan ventajosamente en cultivos de fermentación.

Gracias a la utilización de los ácidos nucleicos según la invención que codifican para una desaturasa, los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el método pueden incrementarse en por lo menos 5%, preferentemente en por lo menos 10%, especialmente preferentemente en por lo menos 20%, muy especialmente preferentemente en por lo menos 50%, en comparación con el tipo salvaje de los organismos que no comprenden los ácidos nucleicos recombinantes.

En principio, los ácidos grasos poliinsaturados producidos mediante el método según la invención en los organismos utilizados en el método pueden incrementarse de dos maneras diferentes. Ventajosamente, puede ampliarse el grupo de ácidos grasos poliinsaturados libres y/o el contenido de ácidos grasos poliinsaturados esterificados producidos mediante el método. Ventajosamente, el grupo de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en los organismos transgénicos se amplía mediante el método según la invención.

En el caso de que se utilicen microorganismos como los organismos en el método según la invención, se cultivan de una manera que resultará familiar al experto en la materia, según el organismo huésped. Como regla general, los microorganismos se cultivan en un medio líquido que comprende una fuente de carbonos, habitualmente en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, habitualmente en forma de fuentes de nitrógeno orgánico, tales como extracto de levadura o sales tales como sulfato de amonio, elementos traza tales como sales de hierro, manganeso y magnesio y, en caso apropiado, vitaminas, a temperaturas de entre 0°C y 100°C, preferentemente de entre 10° y 60°C, introduciendo simultáneamente gas oxígeno. El pH del líquido nutritivo puede mantenerse constante, es decir, regulado durante el periodo de cultivo, o no. Los cultivos pueden cultivarse por lotes, semilotes o en continuo. Los nutrientes pueden proporcionarse al inicio de la fermentación o alimentarse semicontinualmente o en continuo. Los ácidos grasos poliinsaturados producidos pueden aislarse de los organismos tal como se ha indicado anteriormente mediante métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, en caso apropiado mediante precipitación con sal, y/o mediante cromatografía. Con este fin, previamente los organismos pueden romperse ventajosamente.

En el caso de que los organismos huésped sean microorganismos, los métodos según la invención se llevan a cabo ventajosamente a una temperatura de entre 0°C y 95°C, preferentemente de entre 10°C y 85°C, especialmente preferentemente de entre 15°C y 75°C, muy especialmente preferentemente de entre 15°C y 45°C.

En este método, el valor de pH se mantiene ventajosamente entre pH 4 y 12, preferentemente entre pH 6 y 9, especialmente preferentemente entre pH 7 y 8.

El método según la invención puede operarse por lotes, semilotes o en continuo. Puede encontrarse una vista general de los métodos de cultivo conocidos en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Tecnología Biométodo 1. Introducción a la tecnología biométodo](Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y equipos periféricos] (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994))

El medio de cultivo que debe utilizarse debe cumplir convenientemente los requisitos de las cepas en cuestión. Pueden encontrarse descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos en el libro de texto "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Tal como se ha indicado anteriormente, estos métodos que pueden utilizarse según la invención habitualmente comprenden una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos traza.

Las fuentes de carbono preferentes son azúcares, tales como mono-, di- o poli-sacáridos. Son ejemplos de muy buenas fuentes de carbono, la glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. También pueden añadirse azúcares a los medios mediante compuestos complejos, tales como melazas u otros productos secundarios procedentes de la refinación de azúcares. La adición de mezclas de una diversidad de fuentes de carbono también puede resultar ventajosa. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas tales como, por ejemplo, el aceite de soja, el aceite de girasol, el aceite de cacahuete y/o la grasa de coco; ácidos grasos tales como, por ejemplo, el ácido palmítico, el ácido esteárico y/o el ácido linoleico; alcoholes y/o polialcoholes tales como, por ejemplo, glicerol, metanol y/o etanol, y/o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético y/o ácido láctico.

Las fuentes de nitrógeno habitualmente son compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que comprenden estos compuestos. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno comprenden amonio en forma líquida o gaseosa o sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejo, tales como el licor de maceración del maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto cárnico y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de una mezcla.

Los compuestos de sal inorgánica que pueden encontrarse presentes en el medio comprenden las sales de cloro, fósforo y sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Los compuestos sulfurados inorgánicos tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitas, tetrations, tiosulfatos, sulfuros o alternativamente compuestos de azufre orgánicos tales como mercaptanos y tioles, pueden utilizarse como fuentes de azufre para la producción de productos de química fina que contienen azufre, en particular metionina.

El ácido fosfórico, el dihidrogenofosfato de potasio o el hidrogenofosfato de dipotasio o las sales sódicas correspondientes pueden utilizarse como fuentes de fósforo.

Pueden añadirse agentes quelantes al medio con el fin de mantener los iones metálicos en solución. Los agentes quelantes particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles tales como catecol o protocatecolato y ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico.

Los medios de fermentación utilizados según la invención para cultivar microorganismos habitualmente comprenden además otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o estimuladores del crecimiento, incluyendo, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y sales se derivan frecuentemente de componentes de medios complejos tales como extracto de levadura, melazas, licor de maceración del maíz y similares. Además resulta posible añadir precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos de los medios depende fuertemente del experimento particular y se decide individualmente para cada caso específico. Puede encontrarse información sobre la optimización de los medios en el libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (editores P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997), páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). También pueden obtenerse medios de crecimiento de proveedores comerciales, por ejemplo Standard 1 (Merck) o ICC (infusión de cerebro-corazón, DIFCO) y similares.

Todos los componentes de medio se esterilizan, por calor (20 min. a 1,5 bar y 121°C) o mediante filtración. Los componentes pueden esterilizarse conjuntamente o, en caso necesario, separadamente. Todos los componentes de medio pueden encontrarse presentes al inicio del cultivo o añadirse en continuo o por lotes, según se desee.

La temperatura de cultivo normalmente es de entre 15°C y 45°C, preferentemente de entre 25°C y 40°C, y puede mantenerse constante o alterarse durante el experimento. El pH del medio debe encontrarse comprendido en el intervalo de entre 5 y 8,5, preferentemente es de aproximadamente 7,0. El pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo mediante la adición de compuestos básicos tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amonio acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Puede controlarse la espumación mediante la utilización de antiespumantes tales como, por ejemplo, poliglicol-ésteres de ácido graso. Para mantener la estabilidad de los plásmidos resulta posible añadir al medio sustancias adecuadas que presentan un efecto selectivo, por ejemplo antibióticos. Se mantienen condiciones aeróbicas mediante la introducción de oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno tales como, por ejemplo, aire ambiente, en el cultivo. La temperatura del cultivo normalmente es de entre 20°C y 45°C y preferentemente de entre 25°C y 40°C. El cultivo se continúa hasta que la formación del producto deseado alcanza un máximo. El objetivo normalmente se alcanza en un periodo de entre 10 y 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera, en particular aquellos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, habitualmente contienen una masa seca de entre 7,5% y 25% en peso.

El caldo de fermentación seguidamente puede continuar el procedimiento. La biomasa puede, según un requisito, eliminarse por completo o parcialmente del caldo de fermentación mediante métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantado o una combinación de estos métodos o dejar por completo en dicho caldo. Resulta ventajoso aplicar el método a la biomasa después de su separación.

Sin embargo, el caldo de fermentación también puede espesarse o concentrarse sin separar las células, utilizando métodos conocidos tales como, por ejemplo, con ayuda de un evaporador giratorio, evaporador de película fina, evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración. Finalmente, dicho caldo de fermentación concentrado puede seguir el método para obtener los ácidos grasos presentes en el mismo.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención que participan en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, cofactores de PUFA y enzimas o en el transporte de compuestos lipofílicos a través de membranas se utilizan en el método según la invención para la modulación de la producción de los PUFA en organismos transgénicos, ventajosamente en plantas tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, especies de *Linum* tales como la linaza o el lino, especies de *Brassica* tales como la colza oleaginosa, colza y nabo, pimiento, girasol, borraja, onagra común y tagetes, plantas solanáceas tales como patata,

tabaco, berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisante, mandioca, alfalfa, plantas arbustivas (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (palma de aceite, coco) y hierbas perennes y cultivos forrajeros, directamente (por ejemplo en el caso de que la sobreexpresión u optimización de una proteína de biosíntesis de ácidos grasos presenta un efecto directo sobre el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción de ácidos grasos de organismos modificados) y/o puede presentar un efecto indirecto que sin embargo conduce a un rendimiento, producción y/o eficiencia de producción incrementados de los PUFA o una reducción de compuestos no deseados (por ejemplo en el caso de que la modulación del metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas conduce a modificaciones del rendimiento, producción y/o eficiencia de producción o la composición de los compuestos deseados en las células que, a su vez, pueden afectar a la producción de uno o más ácidos grasos).

La combinación de diversas moléculas precursoras y enzimas de biosíntesis conduce a la producción de diversas moléculas de ácido graso, que presenta un efecto decisivo sobre la composición de lípidos, ya que los ácidos grasos poliinsaturados (=PUFA) no sólo se incorporan en triacilglicerol sino también en lípidos membranales.

Las *Brassicaceae*, *Boraginaceae*, *Primulaceae* o *Linaceae* resultan particularmente adecuadas para la producción de los PUFA, por ejemplo el ácido estearidónico, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico. La linaza (*Linum usitatissimum*) resulta especialmente ventajosamente adecuado para la producción de los PUFA con las secuencias de ácidos nucleicos según la invención, ventajosamente, tal como se indica, en combinación con desaturasas y elongasas adicionales.

La síntesis de lípidos puede dividirse en dos secciones: la síntesis de ácidos grasos y su unión a sn-glicerol-3-fosfato y la adición o modificación de un grupo de cabeza polar. Los lípidos habituales que se utilizan en las membranas comprenden fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y fosfoglicéridos. La síntesis de ácidos grasos se inicia con la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa o en acetil-ACP por la acetil-transacilasa. Tras una reacción de condensación, estas dos moléculas de producto conjuntamente forman acetoacetil-ACP, que es convertido mediante una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación de manera que se obtiene una molécula de ácido graso saturado con la longitud de cadena deseada. La producción de los ácidos grasos insaturados de estas moléculas está catalizada por desaturasas específicas, aeróbicamente mediante oxígeno molecular o anaeróbicamente (con respecto a la síntesis de ácidos grasos en microorganismos, ver F.C. Neidhardt *et al.*, *E. coli* and *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., páginas 612-636, 1996, y referencias citadas en el mismo; Lengeler *et al.*, (Ed.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, y referencias citadas en el mismo, y Magnuson K. *et al.*, *Microbiological Reviews* 57:522-542, 1993, y referencias citadas en el mismo). Para pasar por etapas de elongación adicionales, los ácidos grasos unidos a fosfolípido resultante deben retornarse al grupo de éster de ácido graso-CoA desde los fosfolípidos. Lo anterior resulta posible gracias a las acil-CoA:lisofofosfolípido aciltransferasas. Además, estas enzimas son capaces de transferir los ácidos grasos elongados de los ésteres de CoA de vuelta a los fosfolípidos. En caso apropiado, dicha secuencia de reacción puede atravesarse repetidamente.

Son ejemplos de precursores para la biosíntesis de PUFA, el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido linolénico. Estos ácidos grasos C_{18} deben elongarse a C_{20} y C_{22} con el fin de obtener ácidos grasos del tipo de cadena eicosa y docosa. Con ayuda de las desaturasas utilizadas en el método, tales como las $\Delta 12$ -, $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -, $\omega 3$ -, $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas y/o las $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -elongasas, pueden producirse ventajosamente ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, ventajosamente ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico y utilizarse posteriormente en diversas aplicaciones referentes a alimentos, piensos, cosméticos o farmacéuticos. Los ácidos grasos C_{20} y/o C_{22} con, por lo menos dos, ventajosamente por lo menos tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces en la molécula de ácido graso, preferentemente ácidos grasos C_{20} o C_{22} con ventajosamente cuatro, cinco o seis dobles enlaces en la molécula de ácido graso, pueden prepararse utilizando los enzimas anteriormente indicados. La desaturación puede tener lugar antes o después de la elongación del ácido graso en cuestión. Por ello los productos de las actividades de desaturasa y de las etapas adicionales de desaturación y elongación que resultan posibles producen los PUFA preferentes con un grado más alto de desaturación, incluyendo una elongación adicional de ácidos grasos C_{20} a C_{22} , a ácidos grasos tales como ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico. Los sustratos de las desaturasas y elongasas utilizadas en el método según la invención son ácidos grasos C_{16} , C_{18} o C_{20} , tales como, por ejemplo, ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido α -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosatetraenoico o ácido estearidónico. Los sustratos preferentes son el ácido linoleico, el ácido γ -linolénico y/o ácido α -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico o ácido araquidónico, ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico. Los ácidos grasos C_{20} o C_{22} sintetizados con por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces en el ácido graso se obtienen en el método según la invención en forma del ácido graso libre o en forma de sus ésteres, por ejemplo en forma de sus glicéridos.

El término "glicérido" se entiende que se refiere a un glicerol esterificado con uno, dos o tres radicales carboxilo (mono-, di- o tri-glicérido). El término "glicérido" también se entiende que se refiere a una mezcla de diversos

glicéridos. El glicérido o mezcla de glicéridos puede comprender adiciones adicionales, por ejemplo ácidos grasos libres, antioxidantes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y/o otras sustancias.

Para los fines del método según la invención, un "glicérido" se entiende referido también a derivados de glicerol. Además de los glicéridos de ácido graso anteriormente indicados, entre ellos también se incluyen glicerofosfolípidos y gliceroglicolípidos. Los ejemplos preferentes que pueden mencionarse en el presente contexto son glicerofosfolípidos tales como lecitina (fosfatidilcolina), cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y alquilacilglicerofosfolípidos.

Además, deben translocarse posteriormente ácidos grasos a diversos sitios de modificación e incorporarse en el lípido de almacenamiento de triacilglicerol. Una etapa importante adicional en la síntesis de lípidos es la transferencia de ácidos grasos a los grupos de cabeza polares, por ejemplo por la glicerol ácido graso aciltransferasa (ver Frentzen, *Lipid* 100(4-5):161-166, 1998).

Para publicaciones sobre la biosíntesis de ácidos grasos en plantas y sobre la desaturación, el metabolismo de lípidos y el transporte membranar de compuestos lipídicos, sobre la beta-oxidación, la modificación de ácidos grasos y cofactores, el almacenamiento de triacilglicerol y el ensamblaje de triacilglicerol, incluyendo las referencias en las mismas, ver los artículos siguientes: Kinney, *Genetic Engineering*, Ed.: JK Setlow, 19:149-166, 1997; Ohlrogge y Browse, *Plant Cell* 7:957-970, 1995; Shanklin y Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641, 1998; Voelker, *Genetic Engineering*, Ed.: JK Setlow, 18:111-13, 1996; Gerhardt, *Prog. Lipid R.* 31:397-417, 1992; Gühnemann-Schäfer y Kindl, *Biochim. Biophys. Acta* 1256:181-186, 1995; Kunau *et al.*, *Prog.* 37:73-117, 1998; 34:267-342, 1995; Stymne *et al.*, en: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Ed.: Murata y Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, 1993; Murphy y Ross, *Plant Journal*. 13(1):1-16, 1998.

Los PUFA producidos en el método comprenden un grupo de moléculas que los animales superiores ya no pueden sintetizar y que por lo tanto deben incorporar, o que los animales superiores ya no son capaces de sintetizar por sí mismos en cantidades suficientes y que por lo tanto deben incorporar cantidades adicionales, aunque pueden ser sintetizados fácilmente por otros organismos tales como bacterias; por ejemplo, los gatos ya no son capaces de sintetizar el ácido araquidónico.

Los fosfolípidos para los fines de la invención se entiende que se refieren a fosfatidilcolina, fosfatiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y/o fosfatidilinositol, ventajosamente fosfatidilcolina. La expresión "producción o productividad" es conocida de la técnica y comprende la concentración del producto de fermentación (compuestos de fórmula I) que se forma en un periodo de tiempo concreto y en un volumen de fermentación concreto (por ejemplo kg de producto por hora por litro). Comprende además la productividad en una célula vegetal o en una planta, es decir, el contenido de los ácidos grasos deseados producidos en el método, respecto al contenido de todos los ácidos grasos en dicha célula o planta. La expresión "eficiencia de producción" comprende el tiempo necesario para obtener una cantidad de producción concreta (por ejemplo el tiempo requerido por la célula para establecer un determinado rendimiento de una sustancia química fina). La expresión "rendimiento o rendimiento de producto/carbono" es conocida de la técnica y comprende la eficiencia de la conversión de la fuente de carbono en el producto (es decir, la sustancia química fina). Habitualmente se expresa, por ejemplo, como kg de producto por kg de fuente de carbono. Mediante el incremento del rendimiento o producción del compuesto, se incrementa la cantidad de las moléculas obtenidas de dicho compuesto, o de las moléculas adecuadas de dicho compuesto obtenido, en una cantidad de cultivo específica durante un periodo de tiempo específico. La expresión "biosíntesis o ruta biosintética" es conocida de la técnica y comprende la síntesis de un compuesto, preferentemente un compuesto orgánico, por una célula a partir de intermediarios, por ejemplo en un método multietapa y fuertemente regulado. La expresión "catabolismo o ruta catabólica" es conocida de la técnica y comprende el corte de un compuesto, preferentemente un compuesto orgánico, por una célula, proporcionando catabolitos (en términos más generales, moléculas más pequeñas o menos complejas), por ejemplo en un método multietapa y fuertemente regulado. El término "metabolismo" es conocido de la técnica y comprende la totalidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo. El metabolismo de un determinado compuesto (por ejemplo el metabolismo de un ácido graso) comprende de esta manera la totalidad de las rutas biosintéticas, rutas de modificación y rutas catabólicas de dicho compuesto en la célula que se relacionan con dicho compuesto.

Mediante la utilización, en el método según la invención, de los polinucleótidos según la invención y opcionalmente polinucleótidos adicionales que codifican para enzimas del metabolismo de los lípidos o de los ácidos grasos, resulta posible conseguir diversos efectos ventajosos. De esta manera, resulta posible influir sobre el rendimiento, la producción y/o la eficiencia de producción de los ácidos grasos poliinsaturados en una planta, preferentemente en una planta de cultivo oleaginoso, o en un microorganismo. El número o actividad de los polipéptidos o polinucleótidos según la invención puede incrementarse de manera que se produzcan cantidades más grandes de los productos génicos y, finalmente, mayores cantidades de los compuestos de fórmula general I. Una síntesis de novo en un organismo que, antes de que el gen o genes en cuestión hayan sido introducidos, no presenta la

actividad y capacidad de biosintetizar los compuestos, también resulta posible. Resulta de aplicación lo anterior de manera análoga a la combinación con desaturasas o elongasas adicionales o enzimas adicionales del metabolismo de los ácidos grasos y los lípidos. La utilización de una diversidad de secuencias divergentes, es decir, secuencias que difieren al nivel de la secuencia de ADN, también puede resultar ventajosa en el presente contexto, o

alternativamente la utilización de promotores de la expresión génica que permitan una expresión génica diferente respecto a los tiempos, por ejemplo como función del grado de madurez de una semilla o de un tejido de almacenamiento de aceite.

Mediante la introducción en un organismo, un polinucleótido según la invención solo o en combinación con otros genes en una célula, resulta posible no sólo incrementar el flujo biosintético hacia el producto final, sino también permite incrementar, o crear *de novo*, la composición de triacilglicerol correspondiente. Igualmente, el número o actividad de otros genes que resultan necesarios para la importación de nutrientes para la biosíntesis de uno o más ácidos grasos, aceites, lípidos polares y/o neutros, puede incrementarse, de manera que se incrementa la concentración de estos precursores, cofactores o intermediarios en las células o dentro del compartimiento de almacenamiento, de manera que la capacidad de las células de producir los PUFA se incrementa adicionalmente. Mediante la optimización de la actividad, o el incremento del número, de uno o más polinucleótidos o polipéptidos según la invención que participan en la biosíntesis de estos compuestos, o mediante la destrucción de la actividad de uno o más genes que participan en la degradación de estos compuestos, puede resultar posible incrementar el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción de las moléculas de ácidos grasos y lípidos de los organismos, en particular de las plantas. Los ácidos grasos obtenidos en el método resultan adecuados como materiales de partida para la síntesis química de productos adicionales de interés. Por ejemplo, pueden utilizarse para la preparación de farmacéuticos, alimentos, pienso animales o cosméticos, solos o en combinación unos con otros.

Puede observarse a partir de lo indicado anteriormente que la invención se refiere además a un método para la preparación de una composición de aceites, lípidos o ácidos grasos, que comprende las etapas del método según la invención y la etapa adicional de formular la sustancia en forma de una composición de aceites, lípidos o ácidos grasos.

En una realización preferente de dicho método, la composición de aceites, lípidos o ácidos grasos se formula adicionalmente para proporcionar un fármaco, un producto cosmético, un alimento, un pienso, preferentemente alimento para peces, o un complemento alimenticio.

Finalmente, la invención se refiere al principio de utilización del polinucleótido, el vector, la célula huésped, el polipéptido o el organismo no humano transgénico de la presente invención para la producción de una composición de aceites, lípidos o ácidos grasos. Ésta última seguidamente se utiliza preferentemente como fármaco, producto cosmético, alimento, pienso, preferentemente alimento para peces o como complemento alimenticio.

Figuras

Figura 1: alineación de secuencias de la $\Delta 6$ -desaturasas de *O. tauri* (SEC ID nº 4) con la secuencia de *Emiliana huxleyi* (SEC ID nº 2).

Figura 2: análisis de cromatografía de gases de la alimentación de levaduras transformadas con pYES2.1/V5-His-TOPO (A) y pYES-SEQ1(Eh) (B). La sustancia alimentada era el ácido graso 20:3 Δ 8,11,14 (C). Se demostró la actividad de $\Delta 5$ por la aparición de un pico adicional con la identidad 20:4 Δ 5,8,11,14 (D).

Figura 3: mapa de plásmido del constructo binario LJB1589, transformado en *Brassica napus*, para la síntesis de EPA en semillas.

Figura 4: rutas sintéticas para los PUFA.

Ejemplos

Ejemplo 1: métodos generales de clonación

Algunos métodos de clonación tales como, por ejemplo, cortes de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nitrocelulosa y nilón, el ligamiento de fragmentos de ADN, la transformación de células de *Escherichia coli*, los cultivos bacterianos y el análisis de secuencias de ADN recombinante se llevaron a cabo tal como describen Sambrook *et al.*, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6).

Ejemplo 2: análisis de secuencias del ADN recombinante

Se secuenciaron moléculas de ADN recombinante con un secuenciador de ADN de fluorescencia láser ABI mediante el método de Sanger (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977). Los fragmentos obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa se secuenciaron y se verificaron para evitar errores de la polimerasa en los constructos que debían expresarse.

Ejemplo 3: extracción de lípidos de levaduras y plantas

El efecto de la modificación genética en plantas, hongos, algas, ciliados o sobre la producción de un compuesto deseado (tal como un ácido graso) puede determinarse cultivando los microorganismos modificados o la planta modificada bajo condiciones adecuadas (tales como las indicadas anteriormente) y analizando el medio y/o los componentes celulares para la producción elevada del producto deseado (es decir, de lípidos o de un ácido graso). Estas técnicas analíticas son conocidas por el experto en la materia y comprenden la espectroscopía, la cromatografía de capa fina, diversos tipos de métodos de tinción, métodos enzimáticos y microbiológicos y cromatografía analítica tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, páginas 89-90 y páginas 443 a 613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., *et al.*, "Applications of HPLC in Biochemistry" en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17, 1987; Rehm *et al.*, Biotechnology, vol. 3, capítulo III: "Product recovery and purification", páginas 469-714, VCH: Weinheim, 1993; Belter P.A. *et al.*, Bioseparations: downstream methoding for Biotechnology, John Wiley and Sons, 1988; Kennedy J.F. y Cabral J.M.S., Recovery methods for Biological Materials, John Wiley and Sons, 1992; Shaeiwitz J.A. y Henry J.D., Biochemical Separations, en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3; capítulo 11, páginas 1 a 27, VCH: Weinheim, 1988; y Dechow F.J., Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications, 1989).

Además de los métodos anteriormente indicados, se extraen lípidos vegetales del material vegetal tal como se indica en Cahoon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(22):12935-12940, 1999), y en Browse *et al.*, Analytic Biochemistry 152:141-145, 1986. El análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos o ácidos grasos se describe en Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Escocia: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide -Ayr, Escocia: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 páginas (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research", Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) -16 (1977) bajo el título: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Además de medir el producto final de la fermentación, también resulta posible analizar otros componentes de las rutas metabólicas que se utilizan para la producción del compuesto deseado, tales como intermediarios y productos secundarios, con el fin de determinar la eficiencia de producción global del compuesto. Los métodos analíticos comprenden medir la cantidad de nutrientes en el medio (por ejemplo azúcares, hidrocarburos, fuentes de nitrógeno, fosfato y otros iones), medir la composición de la biomasa y el crecimiento, analizar la producción de metabolitos convencionales de las rutas biosintéticas y medir los gases que se generan durante la fermentación. Los métodos estándares para estas mediciones se describen en Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes y P.F. Stanbury, Ed., IRL Press, páginas 103-129; 131-163 y 165-192 (ISBN 0199635773) y referencias citadas en el mismo.

Un ejemplo es el análisis de ácidos grasos (abreviaturas: MEAG, metil-éster de ácido graso; CG-EM, cromatografía de gases-líquidos/espectrometría de masas; TAG, triacilglicerol; CCF, cromatografía de capa fina).

Puede obtenerse una prueba inequívoca de la presencia de productos ácidos grasos mediante el análisis de organismos recombinantes utilizando métodos analíticos estándares: CG, CG-EM o CCF, tal como se ha descrito en varias ocasiones por Christie y las referencias en el mismo (1997, en: Advances on Lipid Methodology, cuarta edición: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gas-chromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren [Métodos de cromatografía de gases/espectrometría de masas], Lipide 33:343-353).

El material que se analizará puede romperse mediante sonicación, trituración en un molino de vidrio, nitrógeno líquido y trituración o mediante otros métodos aplicables. Tras la rotura, el material debe centrifugarse. El sedimento se resuspende en agua destilada, se calienta durante 10 minutos a 100°C, se enfría sobre hielo y se centrifuga nuevamente, seguido de extracción durante una hora a 90°C en ácido sulfúrico 0,5 M en metanol con dimetoxipropano al 2%, lo que conduce a aceite hidrolizado y compuestos lipídicos, proporcionando lípidos transmetilados. Estos metil-ésteres de ácido graso se extraen en éter de petróleo y finalmente se someten a un análisis de CG utilizando una columna capilar (Chrompack, WCTO sílice fusionado, CP-Wax-52 CB, 25 microM, 0,32 mm) en un gradiente de temperatura de 170°C a 240°C durante 20 minutos y 5 minutos a 240°C. La identidad de los metil-ésteres de ácido graso resultante debe definirse utilizando estándares que se encuentran disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo Sigma).

Ejemplo 4: clonación de un gen de desaturasa procedente del alga *Emiliana huxleyi*

Se realizó una búsqueda en la base de datos de secuencias de *Emiliana huxleyi* utilizando la secuencia conocida de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* (Domergue *et al.*, Biochem. J. 389(pt. 2):483-90, 2005; SEC ID nº 3). Resultó posible identificar una secuencia con homología respecto a la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* (SEC ID nº 4). La secuencia se elongó en la dirección 5' y 3' mediante una RACE-PCR (Clontech, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (SEC ID nº 1) y se comparó la secuencia de aminoácidos codificante (SEC ID nº 2) con la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus tauri* (SEC ID nº 4) en una alineación de secuencias (fig. 1). Según ClustalW, la alineación de secuencias proporciona una identidad de secuencias de 41%. Otras secuencias de aminoácidos tales como, por ejemplo, la $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (documento nº WO 2000/012720) muestran una identidad de 22%.

Para caracterizar las funciones de SEC ID nº 1 y de la secuencia de aminoácidos correspondiente, el marco de lectura abierto del ADN se clonó cadena abajo del promotor GAL1 inducible con galactosa de pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen), dando lugar al plásmido pYES-SEC1(Eh). A continuación, dicho plásmido se transformó en la cepa de levadura INVSC-1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se seleccionó en placas con agar DOB-U basándose en la auxotrofia de uracilo. Se identificaron las colonias positivas mediante PCR. Con este fin, en cada caso se utilizó 1 ml de células descongeladas, dNTP 200 mM, 2,5 U de polimerasa Taq y 100 pmoles de cada cebador para llevar a cabo en un volumen total de 50 ml. Las condiciones de la PCR eran las siguientes: primera desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 2 minutos a 72°C y una última etapa de elongación durante 10 minutos a 72°C. En paralelo, el vector vacío pYES2.1/V5-His-TOPO se transformó de la manera anteriormente indicada en células de levadura competentes de la cepa INVSC-1. Se incubaron células de levadura con los plásmidos pYES-SEC1(Eh) durante 12 h en medio DOB-U líquido a 28°C, 200 rpm, y después durante 12 h adicionales en medio de inducción (DOB-U + galactosa al 2% (p/v) + rafinosa al 2% (p/v) y 250 mM de ácidos grasos añadidos al medio. La especificidad y actividad del gen que debe caracterizarse puede determinarse en referencia a los ácidos grasos añadidos.

Se analizaron levaduras que habían sido transformadas con los plásmidos pYES2/V5-His-TOPO o pYES-SEQ1 (Eh) de la manera siguiente:

Las células de levadura de los cultivos principales se recolectaron mediante centrifugación (100 x g, 5 min., 20°C) y se lavaron con NaHCO₃ 100 mM, pH 8,0, para eliminar el medio residual y los ácidos grasos. Partiendo de los sedimentos de células de levadura, se prepararon metil-ésteres de ácidos grasos (MEAG) mediante metanolisis ácida. Con este fin, se incubaron los sedimentos celulares durante una hora a 80°C conjuntamente con 2 ml de ácido sulfúrico metanólico 1 N y 2% (v/v) de dimetoxipropano. Los MEAG se extrajeron dos veces con éter de petróleo (EP). Para eliminar los ácidos grasos no derivatizados, se lavaron las fases orgánicas en cada caso una vez con 2 ml de NaHCO₃ 100 mM, pH 8,0, y 2 ml de agua destilada. A continuación, se secaron las fases de EP con Na₂SO₄, se evaporaron bajo argón y se introdujeron en 100 µl de EP. Se separaron las muestras en una columna capilar DB-23 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) en un cromatógrafo de gases 6850 de Hewlett-Packard dotado de un detector de ionización de llama. Las condiciones del análisis de CGL eran las siguientes: se programó la temperatura del horno entre 50°C y 250°C con un incremento de 5°C/min. y finalmente 10 min. a 250°C (mantenimiento).

Se identificaron las señales mediante comparación de los tiempos de retención con los estándares de ácido graso correspondientes (Sigma). Se describe la metodología en, por ejemplo, Napier y Michaelson, Lipids 36(8):761-766, 2001; Sayanova *et al.*, Journal of Experimental Botany. 52(360):1581-1585, 2001, Sperling *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 388(2):293-298, 2001, y Michaelson *et al.*, 1998, FEBS Letters. 439(3):215-218.

Determinación de la actividad y sustrato de las desaturasas identificadas

Se determinó la especificidad de sustrato de SEC ID nº 1 tras la expresión y alimentación con diversos ácidos grasos. Inesperadamente, sólo se convirtieron 20:3 Δ 8,11,14 y 20:4 Δ 8,11,14,17 de los sustratos alimentados. De esta manera, la secuencia codificante SEC ID nº 1 presenta actividad de $\Delta 5$ -desaturasa y posteriormente en la presente memoria se denomina d5Des(Eh). La conversión específica de los ácidos grasos alimentados se muestra en la fig. 2. Tras 48 h, 65% a 70% de los ácidos grasos alimentados se habían convertido en el producto, calculando la tasa de conversión con la fórmula siguiente:

$$\text{Tasa de conversión (\%)} = \left[\frac{\text{cantidad de producto}}{\text{cant. de sustrato} + \text{cant. de producto}} \right] \times 100$$

El porcentaje de ácido graso convertido en el total de ácidos grasos era de 7-8%. El ácido graso convertido se distribuyó en cada caso en un 9% a los lípidos fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. El lípido fosfatidilcolina sólo constituía el 2%. Los ácidos grasos restantes se encontraban presentes en los lípidos neutros. El hecho de que sólo una cantidad reducida del producto de d5Des(Eh) se acumulase en fosfatidilcolina, en combinación con la distribución a una multiplicidad de clases de lípido adicionales, demuestra la especificidad de coenzima A de d5Des(Eh).

Ejemplo 7: producción de plantas transgénicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Para producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en plantas se combinaron diversos genes de la ruta metabólica en un vector binario. Para producir el ácido graso ácido araquidónico (20:4 Δ 5,8,11,14), se combinaron genes tales como los indicados en la Tabla 1. Análogamente se combinaron genes tales como los indicados en la Tabla 2, para la producción del ácido graso ácido eicosapentaenoico (20:5 Δ 5,8,11,14,17). Análogamente se combinaron genes tales como los indicados en la Tabla 3, para la producción del ácido graso ácido docosahexaenoico (22:6 Δ 4,7,10,13,16,19).

Tabla 1: combinación de genes para la producción de ácido araquidónico

Genes	Actividad	SEC ID nº
D6Des(Pir)	Δ 6-desaturasa	5
D6Elo(Pp)	Δ 6-elongasa	7
D5Des(Eh)	Δ 5-desaturasa	1
D12Des(Ps)	Δ 12-desaturasa	9

Tabla 2: combinación de genes para la producción de ácido eicosapentaenoico

Genes	Actividad	SEC ID nº
D6Des(Pir)	Δ 6-desaturasa	5
D6Elo(Pp)	Δ 6-elongasa	7
D5Des(Eh)	Δ 5-desaturasa	1
ω 3-Des(Pi)	omega 3-desaturasa	11
D12Des(Ps)	Δ 12-desaturasa	9
D15Des(Perf)	Δ 15-desaturasa	13

Tabla 3: combinación de genes para la producción de ácido docosahexaenoico

Genes	Actividad	SEC ID nº
D6Des(Pir)	Δ 6-desaturasa	5
D6Elo(Pp)	Δ 6-elongasa	7
D5Des(Eh)	Δ 5-desaturasa	1
ω 3-Des(Pi)	omega 3-desaturasa	11
D12Des(Ps)	Δ 12-desaturasa	9
D15Des(Perf)	Δ 15-desaturasa	13
D5Elo(Ot)	Δ 5-elongasa	15
D4Des(Tc)	Δ 4-desaturasa	17

Se generaron vectores de transformación adicionales basados en pSUN-USP para la transformación de plantas. Con este fin se introdujeron sitios de corte NotI en los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante, utilizando las parejas de cebadores siguientes (ver la Tabla 7).

Composición de la mezcla para PCR (50 ml):

- 5,00 μ l de ADNc molde
- 5,00 μ l de tampón 10x (polimerasa Advantage) + $MgCl_2$ 25 mM
- 5,00 μ l de dNTP 2 mM
- 1,25 μ l de cada cebador (10 pmoles/ μ l)
- 0,50 μ l de polimerasa Advantage

Se utilizó la polimerasa Advantage de Clontech.

Condiciones de reacción de PCR:

- Temperatura de hibridación: 1 min. 55°C
- Temperatura de desnaturalización: 1 min. 94°C
- Temperatura de elongación: 2 min. 72°C
- Número de ciclos: 35

Tabla 7: secuencias de cebador (para clonar vectores de transformación basados en pSUN-USP)

Gen	Cebador	SEC ID nº
D6-Des(Pir)	Fwd: gcgccgcgcgcctatggtggacctaagcctgg	18
	Rvs: gcgccggttacatcgctgggaactcgg	19

D5-Des(Eh)	Fwd: gcggccgcgccatgtcattggctgctaaagatg Rvs: gcggccgtcaatgacctgtaactctaac	20 21
O3-Des(Pi)	Fwd: gcggccgcgccatggcgacgaaggaggcgta Rvs: gcggccgcgttacgtggacttggtctggcc	22 23
D6-Elo(Pp)	Fwd: gcggccgcgccatggaggctgtggagagattc Rvs: gcggccgcgtcactcagtttagctccc	24 25
D12Des(Ps)	Fwd: gcggccgccatggcgatcctgaacccggag Rvs: gcggccgcttagagcttcttctgtagaag	26 27
D15Des(Perf)	Fwd: gcggccgccatggccgtttctccggtgc Rvs: gcggccgcctaaatcttttgaaggaaag	28 29
D5Elo(Ot)	Fwd: gcggccgcgccatgagcgctcgggtgcgctg Rvs: gcggccgcgttagtcaattttc	30 31
D4Des(Tc)	Fwd: gcggccgcgccatgacggctggctacgacgag Rvs: gcggccgcgtcaggcagcgctgccagg	32 33

Los productos de PCR se incubaron con el enzima de restricción NotI durante 4 h a 37°C. Se incubó el vector de expresión vegetal pSUN300-USP de la misma manera. A continuación, se separaron los productos de PCR y el vector de 7.624 pb mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron los fragmentos de ADN correspondientes. Se purificó el ADN mediante el kit de purificación en gel de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se ligaron el vector y los productos de PCR. Para este fin se utilizó el kit de ligación rápida de Roche. Los plásmidos generados se verificaron mediante secuenciación.

pSUN300 es un derivado del plásmido pPZP (Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P., The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation, *Plant Mol Biol* 25:989-994, 1994). pSUN-USP se originó a partir de pSUN300, mediante la inserción de un promotor USP en pSUN300 en la forma de un fragmento EcoRI. La señal de poliadenilación era el gen OCS del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (terminador ocs, Genbank nº de acceso V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1(6):499-511, 1982). El promotor USP corresponde a los nucleótidos 1 a 684 (GenBank nº de acceso X56240), en el que parte de la región no codificante del gen USP se encuentra presente en el promotor. El fragmento de promotor que presenta 684 pares de bases de tamaño se amplificó mediante una reacción de PCR utilizando métodos estándares con ayuda de un cebador sintético y mediante un cebador estándar de T7 disponible comercialmente (Stratagene).

(Secuencia de cebador:

**5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
GGATCTGCTGGCTATGAA-3') [SEC ID nº 82].**

Se cortó nuevamente el fragmento de PCR con EcoRI/Sall y se insertó en el vector pSUN300 con terminador OCS. Lo anterior dio lugar al plásmido denominado pSUN-USP, que puede utilizarse para transformar plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

a) Generación de plantas de colza oleaginosa transgénica (método modificado de Moloney *et al.*, *Plant Cell Reports* 8:238-242, 1992).

Para generar plantas de colza transgénica transgénicas, se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:SHA001 vectores binarios tales como los plásmidos pSUN descritos anteriormente en la presente memoria o, a título de ejemplo, el derivado LJB1589 (SEC ID nº 34, mapa del plásmido en la fig. 3) con las combinaciones génicas relevantes (Deblaere *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13:4777-4788, 1984). Se utilizó una dilución 1:50 de un cultivo de durante la noche de una colonia agrobacteriana transformada positivamente en medio de Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, *Physiol. Plant.* 15:473, 1962) complementado con sacarosa al 3% (medio 3MS) para transformar plantas de colza oleaginosa (cv. Kumily, Swalöf Weibull, Suecia). Se incubaron petioles o hipocótilos de plantas de colza oleaginosa transgénica recién germinadas (en cada caso aprox. 1 cm²) con una dilución agrobacteriana 1:50 durante 5 a 10 minutos en una placa de Petri. Tras lo anterior se llevó a cabo una coincubación de 3 días en la oscuridad a 25°C en medio 3MS complementado con agar Bacto al 0,8%. Tras 3 días, se continuó el cultivo bajo 16 horas de luz/8 horas de oscuridad y se continuó, en un ritmo de 1 semana, en medio MS complementado con 500 mg/l de Claforan (cefotaxim-sodio), 50 mg/l de canamicina, 20 microM de bencilaminopurina (BAP) y 1,6 g/l de sacarosa. Se transfirieron brotes en crecimiento a medio MS complementado con sacarosa al 2%, 250 mg/l de Claforan y agar Bacto al 0,8%. En caso de no formarse raíces tras tres semanas, se añadió la hormona del crecimiento ácido 2-indolbutírico al medio para estimular el crecimiento de raíces.

Los brotes regenerados se obtuvieron en medio 2MS complementado con canamicina y Claforan, se transfirieron a tierra tras enraizar y tras el cultivo durante dos semanas en un armario de ambiente controlado o en un invernadero, se indujo la floración, se recolectaron las semillas maduras y se analizaron para la expresión de los genes de desaturasa o de elongasa mediante análisis de lípidos tal como se describe a título de ejemplo en Qiu *et al.*, J. Biol. Chem. 276:31561-31566, 2001.

b) Generación de plantas de linaza transgénicas

Las plantas de linaza transgénicas pueden generarse mediante, por ejemplo, el método de Bell *et al.*, *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 35(6):456-465, 1999, mediante bombardeo de partículas. Las transformaciones mediadas agrobacterianamente pueden llevarse a cabo tal como se describe en, por ejemplo, Mlynarova *et al.*, Plant Cell Report 13: 282-285, 1994.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF PLANT SCIENCE GMBH

<120> Desaturasa y método de producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos

<130> BPS65606PC

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1368

<212> ADN

<213> Emiliana huxleyi

<400> 1

ES 2 536 796 T3

atgtcattgg	ctgctaaaga	tgcagcctcg	gccactcat	ccgtcttggga	ccctaagtat	60
cacggagcta	caaataagtc	aagaactgat	gcagcagacc	ttacagttag	ttctatcgac	120
acttctaagg	agatgatcat	aaggggtcgt	gtgtatgatg	tctctgattt	tattaaaagg	180
cacccgggag	gaagcattat	taaactctcc	ttaggttctg	atgcaacaga	cgcttataac	240
aacttccata	ttaggtctaa	aaaagcggat	aaaatgttga	gagctttgcc	aagtaggcca	300
gtagcggatg	gattcgctag	agacgctttg	tctgcagact	tcgaggccct	gagagcccaa	360
ctcgaggccg	aaggttactt	cgaaccgaat	ctgtggcatg	tagcttatcg	agttgcggaa	420
gtcgttgcta	tgtactgggc	gggtattaga	cttatctggg	cgggttattg	gtttttagga	480
gccattgtag	caggaatagc	tcaggggaga	tgcggttggc	ttcagcatga	gggtggtcac	540
tattcgctca	caggtaatat	taaacttgat	cgacacatgc	aaatgattat	ctatggatta	600
ggttgcggaa	tgtccggttg	ttattggaga	aaccaacata	acaagcacca	tgcgacaccg	660
caaaagttag	gtgcagatcc	agaccttcaa	acaatgcctc	tggttgcgtt	ccatggactc	720
atcggtgcta	aggctagggg	agcaggaaaag	tcgtggctag	catggcaagc	tccacttttc	780
tttgaggcg	ttatcacaac	cctggatatct	tttggttggc	agttcgtcca	acatccaaag	840
cacgcattga	gagtaggaaa	ccaactcgaa	ttaggctata	tggctttacg	atatgcttta	900
tggtatgcag	cattcggtca	tcttgggctt	ggtggtgctt	tcagattgta	cgctttttat	960
gtggcagtcg	gaggtacata	tatcttcacg	aactttgcgg	tgtctcacac	acataaggat	1020
gttgttccac	acgataagca	tatttcttgg	accttgtatt	ctgcaaacca	taccactaat	1080
caatctaaca	cacctctagt	caattgggtg	atggcctatc	tgaattttca	aattgaacat	1140
caccttttcc	ctagcatgcc	acaatataac	catcctaaaa	tctgcggaag	agtgaacaaa	1200
ttgtttgaaa	aacatggcgt	agagtacgat	gtcagaactt	acgcgaagtc	aatgcgtgat	1260
acatacgtga	atctcttggc	tgtgggaaat	gcattctcatt	cccttcatca	gagaaacgag	1320
ggattaacga	ctagggagtc	tgcggctgtt	agagttacag	gtcattga		1368

<210> 2
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Emiliana huxleyi

<400> 2

ES 2 536 796 T3

Met Ser Leu Ala Ala Lys Asp Ala Ala Ser Ala His Ser Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Pro Lys Tyr His Gly Ala Thr Asn Lys Ser Arg Thr Asp Ala Ala
 20 25 30
 Asp Leu Thr Val Ser Ser Ile Asp Thr Ser Lys Glu Met Ile Ile Arg
 35 40 45
 Gly Arg Val Tyr Asp Val Ser Asp Phe Ile Lys Arg His Pro Gly Gly
 50 55 60
 Ser Ile Ile Lys Leu Ser Leu Gly Ser Asp Ala Thr Asp Ala Tyr Asn
 65 70 75 80
 Asn Phe His Ile Arg Ser Lys Lys Ala Asp Lys Met Leu Arg Ala Leu
 85 90 95
 Pro Ser Arg Pro Val Ala Asp Gly Phe Ala Arg Asp Ala Leu Ser Ala
 100 105 110
 Asp Phe Glu Ala Leu Arg Ala Gln Leu Glu Ala Glu Gly Tyr Phe Glu
 115 120 125
 Pro Asn Leu Trp His Val Ala Tyr Arg Val Ala Glu Val Val Ala Met
 130 135 140
 Tyr Trp Ala Gly Ile Arg Leu Ile Trp Ala Gly Tyr Trp Phe Leu Gly
 145 150 155 160
 Ala Ile Val Ala Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Gln His
 165 170 175
 Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Lys Leu Asp Arg His
 180 185 190
 Met Gln Met Ile Ile Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met Ser Gly Cys Tyr
 195 200 205
 Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gly
 210 215 220
 Ala Asp Pro Asp Leu Gln Thr Met Pro Leu Val Ala Phe His Gly Leu
 225 230 235 240
 Ile Gly Ala Lys Ala Arg Gly Ala Gly Lys Ser Trp Leu Ala Trp Gln
 245 250 255
 Ala Pro Leu Phe Phe Gly Gly Val Ile Thr Thr Leu Val Ser Phe Gly

ES 2 536 796 T3

[illegible]

<210> 3
<211> 1371
<212> ADN
<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 3

ES 2 536 796 T3

atgtgtgttg agaccgagaa caacgatgga atccctactg tggagatcgc tttcgatgga	60
gagagagaaa gagctgaggc taacgtgaag ttgtctgctg agaagatgga acctgctgct	120
ttggctaaga ctttcgctag aagatacgtg gttatcgagg gagttgagta cgatgtgacc	180
gatttcaaac atcctggagg aaccgtgatt ttctacgctc tctctaacac tggagctgat	240
gctactgagg ctttcaagga gttccaccac agatctagaa aggctaggaa ggctttggct	300
gctttgcctt ctagacctgc taagaccgct aaagtggatg atgctgagat gctccaggat	360
ttcgctaagt ggagaaagga gttggagagg gacggattct tcaagccttc tcctgctcat	420
gttgcttaca gattcgctga gttggctgct atgtacgctt tgggaaccta cttgatgtac	480
gctagatacg ttgtgtcctc tgtgttggtt tacgcttgct tcttcggagc tagatgtgga	540
tgggttcaac atgagggagg acattcttct ttgaccgaa acatctggtg ggataagaga	600
atccaagctt tctactgctg attcggattg gctggatctg gagatatgtg gaactccatg	660
cacaacaagc accatgctac tcctcaaaaa gtgaggcacg atatggattt ggataccact	720
cctgctgttg ctttcttcaa caccgctgtg gaggataata gacctagggg attctctaag	780
tactggctca gattgcaagc ttggaccttc attcctgtga cttctggatt ggtgttgctc	840
ttctggatgt tcttctcca tccttctaag gctttgaagg gaggaaagta cgaggagctt	900
gtgtggatgt tggctgctca tgtgattaga acctggacca ttaaggctgt tactggattc	960
accgctatgc aatcctacgg actcttcttg gctacttctt gggtttccgg atgctacttg	1020
ttcgctcact tctctacttc tcacacccat ttggatgttg ttcctgctga tgagcatttg	1080
tcttgggtta ggtacgctgt ggatcacacc attgatatcg atccttctca gggatgggtt	1140
aactggttga tgggatactt gaactgcaa gtgattcatc acctcttccc ttctatgcct	1200
caattcagac aacctgaggt gtccagaaga ttcgttgctt tcgctaagaa gtggaacctc	1260
aactacaagg tgatgactta tgctggagct tggaaggcta ctttgggaaa cctcgataat	1320
gtgggaaagc actactacgt gcacggacaa cattctggaa agaccgcttg a	1371

<210> 4

<211> 456

5 <212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 4

ES 2 536 796 T3

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
 20 25 30
 Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
 35 40 45
 Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
 50 55 60
 Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
 85 90 95
 Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
 100 105 110

ES 2 536 796 T3

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
 115 120 125
 Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
 130 135 140
 Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
 145 150 155 160
 Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
 165 170 175
 Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
 180 185 190
 Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
 195 200 205
 Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
 210 215 220
 His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
 245 250 255
 Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
 260 265 270
 Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
 275 280 285
 Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
 290 295 300
 Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
 305 310 315 320
 Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
 325 330 335
 Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
 340 345 350
 Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
 355 360 365
 His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
 370 375 380

ES 2 536 796 T3

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
 385 390 395 400
 Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
 405 410 415
 Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
 420 425 430
 Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
 435 440 445
 Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
 450 455

<210> 5
 <211> 1380
 <212> ADN
 <213> Pythium irregulare

<400> 5

ES 2 536 796 T3

atggtggacc tcaagcctgg agtgaagcgc ctggtgagct ggaaggagat ccgcgagcac	60
gcgacgcccc cgaccgcgtg gatcgtgatt caccacaagg tctacgacat ctccaagtgg	120
gactcgcacc cgggtggctc cgtgatgctc acgcaggccg gcgaggacgc cacggacgcc	180
ttcgcggtct tccaccgctc ctcggcgctc aagctgctcg agcagttcta cgtcggcgac	240
gtggacgaaa cctccaaggc cgagatcgag ggggagccgg cgagcgacga ggagcgcgcg	300
cgccgcgagc gcatcaacga gttcatcgcg tcctaccgcc gtctgcgcgt caaggtcaag	360
ggcatggggc tctacgacgc cagcgcgctc tactacgcgt ggaagctcgt gagcacgttc	420
ggcatcgcgg tgctctcgat ggcgatctgc ttcttcttca acagtttcgc catgtacatg	480
gtcgccggcg tgattatggg gctcttctac cagcagtccg gatggctggc gcacgacttc	540
ttgcacaacc aggtgtgcga gaaccgcacg ctcggcaacc ttatcggctg cctcgtgggc	600
aacgcctggc agggcttcag catgcagtgg tggaagaaca agcacaacct gcaccacgcg	660
gtgccgaacc tgcacagcgc caaggacgag ggcttcatcg gcgacccgga catcgacacc	720
atgccgctgc tggcgtggtc taaggagatg gcgcgcaagg cgttcgagtc ggcgcacggc	780
ccgttcttca tccgcaacca ggcgttctta tacttcccg cgtctgctgct cgcgcgcctg	840
agctggctcg cgcagtcgtt cttctacgtg ttcaccgagt tctcgttcgg catcttcgac	900
aaggtcgagt tcgacggacc ggagaaggcg ggtctgatcg tgcactacat ctggcagctc	960
gcgatcccgt acttctgcaa catgagcctg tttgagggcg tggcatactt cctcatgggc	1020
caggcgtcct gcggcttgct cctggcgctg gtgttcagta ttggccacaa cggcatgtcg	1080
gtgtacgagc gcgaaaccaa gccggacttc tggcagctgc aggtgaccac gacgcgcaac	1140
atccgcgcgt cggatttcac ggactggttc accggtggct tgaactacca gatcgaccat	1200
cacctgttcc cgctcgtgcc gcgccacaac ttgccaaagg tcaacgtgct catcaagtcg	1260
ctatgcaagg agttcgacat cccgttccac gagaccggct tctgggaggg catctacgag	1320
gtcgtggacc acctggcgga catcagcaag gaatttatca ccgagttccc agcgatgtaa	1380

<210> 6

<211> 459

5 <212> PRT

<213> Pythium irregulare

<400> 6

ES 2 536 796 T3

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu
 1 5 10 15
 Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His
 20 25 30
 Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val
 35 40 45
 Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe
 50 55 60
 His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp
 85 90 95
 Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr
 100 105 110
 Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser
 115 120 125
 Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val
 130 135 140
 Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met
 145 150 155 160
 Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu
 165 170 175
 Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly
 180 185 190
 Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Met
 195 200 205
 Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu
 210 215 220
 His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr
 225 230 235 240

ES 2 536 796 T3

Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu
245 250 255

Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe
260 265 270

Pro Leu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe
275 280 285

Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe
290 295 300

Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu
305 310 315 320

Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr
325 330 335

Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe
340 345 350

Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro
355 360 365

Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser
370 375 380

Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His
385 390 395 400

His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val
405 410 415

Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr
420 425 430

Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile
435 440 445

Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met
450 455

<210> 7

<211> 873

<212> ADN

<213> Physcomitrella patens

<400> 7

ES 2 536 796 T3

atggaggctcg tggagagatt ctacggtgag ttggatggga aggtctcgca gggcgtgaat	60
gcattgctgg gtagttttgg ggtggagttg acggatacgc ccactaccaa aggcttgccc	120
ctcgttgaca gtccacacacc catcgtcctc ggtgtttctg tatacttgac tattgtcatt	180
ggaggggcttt tgtggataaa ggccagggat ctgaaaccgc gcgcctcgga gccatttttg	240
ctccaagctt tggtgcttgt gcacaacctg ttctgttttg cgctcagtct gtatatgtgc	300
gtgggcatcg cttatcaggc tattacctgg cggctactctc tctggggcaa tgcatacaat	360
cctaaacata aagagatggc gattctggta tacttgttct acatgtctaa gtacgtggaa	420
ttcatggata ccgttatcat gatactgaag cgcagcacca ggcaaataag cttcctccac	480
gtttatcatc attcttcaat ttccctcatt tgggtgggcta ttgctcatca cgctcctggc	540
ggtgaagcat attggtctgc ggctctgaac tcaggagtgc atgttctcat gtatgcgtat	600
tacttcttgg ctgcctgcct tcgaagtagc ccaaagttaa aaaataagta ccttttttgg	660
ggcagggtact tgacacaatt ccaaagtgtc cagtttatgc tgaacttagt gcaggcttac	720
tacgacatga aaacgaatgc gccatatcca caatggctga tcaagatttt gttctactac	780
atgatctcgt tgctgtttct tttcggcaat ttttacgtac aaaaatacat caaacctct	840
gacggaaagc aaaagggagc taaaactgag tga	873

<210> 8

<211> 290

5 <212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 8

ES 2 536 796 T3

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

ES 2 536 796 T3

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285
 Thr Glu
 290

<210> 9
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Phytophthora sojae
 <400> 9

atggctat	ttt tgaaccctga	ggctgattct	gctgctaacc	tcgctactga	ttctgaggct	60
aagcaaaga	c aattggctga	ggctggatac	actcatgttg	agggtgctcc	tgctcctttg	120
cctttggagt	tgccctcattt	ctctctcaga	gatctcagag	ctgctattcc	taagcactgc	180
ttcgagagat	ctttcgtgac	ctccacctac	tacatgatca	agaacgtggt	gacttgcgct	240
gctttgttct	acgctgctac	cttcattgat	agagctggag	ctgctgctta	tgttttgtgg	300
cctgtgtact	ggttcttcca	gggatcttac	ttgactggag	tgtgggttat	cgctcatgag	360
tgtggacatc	aggcttattg	ctcttctgag	gtgggtgaaca	acttgattgg	actcgtgttg	420
cattctgctt	tgttgggtgcc	ttaccactct	tggagaatct	ctcacagaaa	gcaccattcc	480
aacactggat	cttgcgagaa	cgatgagggt	ttcgttcctg	tgaccagatc	tgtgttggct	540
tcttcttgga	acgagacctt	ggaggattct	cctctctacc	aactctaccg	tatcgtgtac	600
atgttggttg	ttggatggat	gcctggatac	ctcttcttca	acgctactgg	acctactaag	660
tactggggaa	agtctagggtc	tcacttcaac	ccttactccg	ctatctatgc	tgatagggag	720
agatggatga	tcgtgctctc	cgatattttc	ttgggtggcta	tgttggtgtg	tttggctgct	780
ttggtgcaca	ctttctcctt	caacaccatg	gtgaagttct	acgtgggtgcc	ttacttcatt	840
gtgaacgctt	acttgggtgtt	gattacctac	ctccaacaca	ccgataccta	catccctcat	900
ttcagagagg	gagagtggaa	ttggttgaga	ggagctttgt	gcactgtgga	tagatcattt	960
gggccattcc	tcgattctgt	ggtgcataga	atcgtggata	cccatgtttg	ccaccacatc	1020
ttctccaaga	tgcccttctta	tcattgagag	gaggctacca	acgctattaa	gcctctcctc	1080
ggaaagtctt	acttgaagga	taccactcct	gttcctgttg	ctctctggag	atcttacacc	1140
cattgcaagt	tcgttgagga	tgatggaaaag	gtgggtgttct	acaagaacaa	gctctag	1197

<210> 10

<211> 398

5 <212> PRT

<213> Phytophthora sojae

<400> 10

ES 2 536 796 T3

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

ES 2 536 796 T3

Ser Val Leu Ala Ser Ser Trp Asn Glu Thr Leu Glu Asp Ser Pro Leu
 180 185 190
 Tyr Gln Leu Tyr Arg Ile Val Tyr Met Leu Val Val Gly Trp Met Pro
 195 200 205
 Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr Gly Pro Thr Lys Tyr Trp Gly Lys
 210 215 220
 Ser Arg Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ala Ile Tyr Ala Asp Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Trp Met Ile Val Leu Ser Asp Ile Phe Leu Val Ala Met Leu Ala
 245 250 255
 Val Leu Ala Ala Leu Val His Thr Phe Ser Phe Asn Thr Met Val Lys
 260 265 270
 Phe Tyr Val Val Pro Tyr Phe Ile Val Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile
 275 280 285
 Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr Tyr Ile Pro His Phe Arg Glu Gly
 290 295 300
 Glu Trp Asn Trp Leu Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Phe
 305 310 315 320
 Gly Pro Phe Leu Asp Ser Val Val His Arg Ile Val Asp Thr His Val
 325 330 335
 Cys His His Ile Phe Ser Lys Met Pro Phe Tyr His Cys Glu Glu Ala
 340 345 350
 Thr Asn Ala Ile Lys Pro Leu Leu Gly Lys Phe Tyr Leu Lys Asp Thr
 355 360 365
 Thr Pro Val Pro Val Ala Leu Trp Arg Ser Tyr Thr His Cys Lys Phe
 370 375 380
 Val Glu Asp Asp Gly Lys Val Val Phe Tyr Lys Asn Lys Leu
 385 390 395

<210> 11
 <211> 1086
 <212> ADN
 <213> Phytophthora infestans

<400> 11

ES 2 536 796 T3

atggcgacga aggagggcgta tgtgttcccc actctgacgg agatcaagcg gtcgctacct	60
aaagactggt tcgaggcttc ggtgcctctg tcgctctact acaccgtgcg ttgtctggtg	120
atcgcggtgg ctctaacctt cggctctcaac tacgctcgcg ctctgcccga ggtcgagagc	180
ttctgggctc tggacgccgc actctgcacg ggctacatct tgctgcaggg catcgtgttc	240
tggggcttct tcacgggtggg ccacgatgcc ggccacggcg ccttctcgcg ctaccacctg	300
cttaacttcg tgggtgggcac tttcatgcac tcgctcatcc tcacgccctt cgagtcgtgg	360
aagctcacgc accgtcacca ccacaagaac acgggcaaca ttgaccgtga cgaggctctc	420
tacccgcaac gcaaggccga cgaccacccg ctgtctcgca acctgattct ggcgctcggg	480
gcagcgtggc tcgcctatct ggtcgagggc ttccctcctc gtaagggtcaa ccacttcaac	540
ccgttcgagc ctctgttcgt gcgtcaggtg tcagctgtgg taatctctct tctcgcccac	600
ttcttcgtgg ccggactctc catctatctg agcctccagc tgggccttaa gacgatggca	660
atctactact atggacctgt ttttgtgttc ggcagcatgc tggtcattac caccttccta	720
caccacaatg atgaggagac cccatggtac gccgactcgg agtggacgta cgtcaagggc	780
aacctctcgt ccgtggaccg atcgtaaggc gcgctcattg acaacctgag ccacaacatc	840
ggcacgcacc agatccacca ccttttccct atcattccgc actacaaact caagaaagcc	900
actgcggcct tccaccaggc tttccctgag ctcgctcgca agagcgacga gcccaattatc	960
aaggctttct tccgggttgg acgtctctac gcaaactacg gcgttggtga ccaggaggcg	1020
aagctcttca cgctaaagga agccaaggcg gcgaacgagg cggcggccaa gaccaagtcc	1080
acgtaa	1086

<210> 12

<211> 361

5 <212> PRT

<213> Phytophthora infestans

<400> 12

ES 2 536 796 T3

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
 1 5 10 15
 Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly
 35 40 45
 Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
 65 70 75 80
 Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
 85 90 95
 Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu
 100 105 110
 Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
 115 120 125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
 130 135 140
 Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
 165 170 175
 Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
 180 185 190
 Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu
 225 230 235 240
 His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
 245 250 255
 Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
 260 265 270
 Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
 275 280 285
 Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
 290 295 300
 His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
 305 310 315 320
 Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
 325 330 335
 Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
 340 345 350
 Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
 355 360

<210> 13
 <211> 1176
 <212> ADN
 <213> Perilla fruticosa

<400> 13

atggctgttt cttctggagc taggccttct aagtctggag ctgatggaga agttttcgat	60
ggacagcaac agtacgaggg aattggaaag agagctgctg ataagtttga tcctgctgct	120
cctcctcctt tcaagatcgc tgatatcagg gctgctattc ctgctcattg ctgggttaag	180
aacccttgga ggagtctttc ttacgttggtg tgggatgttg ctgctgtttt cgctcttctt	240
gctgctgctg tgtacattaa ctcttgggct ttctggcctg tttactggat tgctcaggga	300
actatgttct gggctctttt cgcttcttgga cagcattgtg gacacggatc tttctctgat	360
aacactactc ttaacaacgt tgtgggacac gttcttcact cttctatcct tgtgccttac	420
cacggatgga gaatctctca taggactcac catcagaacc atggacacgt tgagaaggat	480
gagtcttggg ttccacttcc tgagaacctt tacaagaagc ttgatttctc tactaagttc	540
cttaggtaca agatcccttt ccctatgttc gcttaccctc tttacccttg gtacagatct	600
cctggaaaga ctggatctca cttcaaccct tactctgata ttttcaagcc taacgagagg	660
ggacttatcg tgacttctac tatgtgttg gctgctatgg gagtgtttct tctttacgct	720
tctactatcg tgggtcctaa catgatgttc aagctttacg gagtgcctta ccttattttc	780
gtgatgtggc ttgatactgt gacttacctt caccaccacg gatacgataa gaagcttcct	840
tggtagaggt caaaggagtg gtcttacctt agaggaggac ttactactgt ggatcaggat	900
tacggattct tcaacaagat ccaccacgat attggaactc acgtgatcca tcaccttttc	960
cctcagattc ctcactacca ccttggtgag gctactagag aggctaagag ggtgttggga	1020
aactactacc gtgagcctag aaagtctgga cctgtgcctc ttcactttat ccctgctctt	1080
ttgaagtctc ttggaaggga tcactacgtg tctgataacg gagatatcgt gtactaccag	1140
actgatgatg agcttttccc ttctaagaag atctga	1176

<210> 14
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Perilla fruticosa

<400> 14

5

ES 2 536 796 T3

Met Ala Val Ser Ser Gly Ala Arg Leu Ser Lys Ser Gly Ala Asp Gly
1 5 10 15

Glu Val Phe Asp Gly Gln Gln Gln Tyr Glu Gly Ile Gly Lys Arg Ala
20 25 30

Ala Asp Lys Phe Asp Pro Ala Ala Pro Pro Pro Phe Lys Ile Ala Asp
35 40 45

Ile Arg Ala Ala Ile Pro Ala His Cys Trp Val Lys Asn Pro Trp Arg
50 55 60

Ser Leu Ser Tyr Val Val Trp Asp Val Ala Ala Val Phe Ala Leu Leu
65 70 75 80

Ala Ala Ala Val Tyr Ile Asn Ser Trp Ala Phe Trp Pro Val Tyr Trp
85 90 95

Ile Ala Gln Gly Thr Met Phe Trp Ala Leu Phe Val Leu Gly His Asp
100 105 110

Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Asn Thr Thr Leu Asn Asn Val Val
115 120 125

Gly His Val Leu His Ser Ser Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg
130 135 140

Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Lys Asp
145 150 155 160

Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Asn Leu Tyr Lys Lys Leu Asp Phe
165 170 175

Ser Thr Lys Phe Leu Arg Tyr Lys Ile Pro Phe Pro Met Phe Ala Tyr
180 185 190

Pro Leu Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Thr Gly Ser His Phe
195 200 205

Asn Pro Tyr Ser Asp Leu Phe Lys Pro Asn Glu Arg Gly Leu Ile Val
210 215 220

Thr Ser Thr Met Cys Trp Ala Ala Met Gly Val Phe Leu Leu Tyr Ala
225 230 235 240

Ser Thr Ile Val Gly Pro Asn Met Met Phe Lys Leu Tyr Gly Val Pro
245 250 255

Tyr Leu Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu His His
260 265 270

His Gly Tyr Asp Lys Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Ser Lys Glu Trp Ser
275 280 285

Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Val Asp Gln Asp Tyr Gly Phe Phe
290 295 300

Asn Lys Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His Leu Phe
305 310 315 320

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

Arg Val Leu Gly Asn Tyr Tyr Arg Glu Pro Arg Lys Ser Gly Pro Val
340 345 350

Pro Leu His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Lys Ser Leu Gly Arg Asp His
355 360 365

ES 2 536 796 T3

Tyr Val Ser Asp Asn Gly Asp Ile Val Tyr Tyr Gln Thr Asp Asp Glu
370 375 380

Leu Phe Pro Ser Lys Lys Ile
385 390

5 <210> 15
<211> 903
<212> ADN
<213> *Ostreococcus tauri*

10 <400> 15

```

atgtctgctt ctggagcttt gttgcctgct attgctttcg ctgcttacgc ttacgctacc      60
tacgcttatg ctttcgagtg gtctcatgct aacggaatcg ataacgtgga tgctagagag      120
tggattggag ctttgtcttt gagactccct gcaattgcta ccaccatgta cctcttgttc      180
tgccttgctg gacctagatt gatggctaag agggaggctt ttgatcctaa gggattcatg      240
ctcgcttaca acgcttacca aaccgctttc aacgttgctg tgctcggaat gttcgctaga      300
gagatctctg gattgggaca acctgtttgg ggatctacta tgccttgagg cgataggaag      360
tccttcaaga ttttggtggg agtgtggctc cattacaaca ataagtacct cgagttgttg      420
gatactgtgt tcatggtggc taggaaaaag accaagcagc tctctttctt gcatgtgtac      480
catcatgctt tggtgatttg ggcttggtgg cttgtttgtc atctcatggc taccaacgat      540
tgcacatgat cttatttcgg agctgcttgc aactctttca tccacatcgt gatgtactcc      600
tactacctca tgtctgcttt gggaattaga tgcccttgga agagatatat caccaggct      660
cagatgttgc aattcgtgat cgtgttcgct catgctgttt tcgtgctcag acaaaagcac      720
tgccctgtta ctttgccctg ggcacaaatg ttcgtgatga caaatatgtt ggtgctcttc      780
ggaaacttct acctcaaggc ttactctaac aagtctaggg gagatggagc ttcttctgtt      840
aagcctgctg agactactag agcaccttct gtgagaagaa ccagggtccag gaagatcgat      900
tga                                          903

```

15 <210> 16
<211> 300
<212> PRT
<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 16

ES 2 536 796 T3

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr
1 5 10 15
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly
20 25 30
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg
35 40 45
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly
50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met
65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly
85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser
100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val
115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe
130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr
145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met
165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser
180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly
195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln
210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His
225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met
245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser
260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala
275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp
290 295 300

<210> 17

<211> 1560

<212> ADN

<213> Thraustochytrium ssp.

<400> 17

atgactgttg gatacgaatg ggagatccca ttcgagcaag ttagggctca taacaagcca	60
gatgatgctt ggtgtgctat tcatggacac gtgtacgatg ttaccaagtt cgcttctgtt	120
catccaggag gagatattat cttgctcgct gctggaaagg aagctactgt gctctacgag	180
acctaccatg ttagaggagt gtctgatgct gtgctcagaa agtacagaat cggaaagttg	240
ccagatggac aaggaggagc taacgagaag gagaagagaa ccttgtcttg attgtcctct	300
gcttcttact acacctggaa ctccgatttc tacagagtga tgagggagag agttgtggct	360
agattgaagg agagaggaaa ggctagaaga ggaggatacg agttgtggat caaggctttc	420
ttgctccttg ttggattctg gtcctctctt tactggatgt gcaccctcga tccatctttc	480
ggagctatct tggctgctat gtctttggga gtgttcgctg cttttgttgg aacctgcac	540
caacatgatg gaaacctagg agctttcgct caatctagat gggtaacaa ggtggcagga	600
tggacttttg atatgatcgg agcttctgga atgacttggg agttccaaca tgtgttggga	660
catcacccat acactaactt gatcgaggag gagaacggat tgcaaaaggt gtccggaaag	720
aagatggata ccaagttggc tgatcaagag tctgatccag atgtgttctc cacctacca	780
atgatgagat tgcattcatg gcatcagaag agatggatc acaggttcca gcatactac	840
ggaccattca tcttcggatt catgaccatc aacaagggtg tgactcaaga tgttgagtg	900
gtgttgagaa agaggctctt ccaaactgat gctgagtga gatatgcttc ccaatgtac	960
gttgctaggt tctggatcat gaaggctttg accgtgttgt acatggttgc tctcccatgt	1020
tatatgcaag gaccatggca tggattgaag ctcttcgcta tcgctcattt cacttgcgga	1080
gaggttttgg ctaccatgtt catcgtgaac cacattatcg agggagtgtc ttacgcttct	1140
aaggatgctg ttaagggaac tatggctcca ccaaagacta tgcattggagt gaccccaatg	1200
aacaacacta gaaaggagggt tgaggctgag gcttctaagt ctggagctgt ggttaagtct	1260
gtgccattgg atgattgggc tgctgttcaa tgccaaacct ctgtgaactg gtctgttgga	1320
tcttggttct ggaaccattt ctctggagga ctcaaccatc aaatcgagca tcatctcttc	1380
ccaggattgt ctacagagac ctactaccac atccaagatg tggttcaatc tacctgtgct	1440
gagtacggag ttccatacca acatgagcca tctttgtgga ctgcttactg gaagatgctc	1500
gaacatttga gacaattggg aaacgaggag actcacgagt cttggcaaag agctgcttga	1560

<210> 18

<211> 519

<212> PRT

<213> Thraustochytrium ssp.

<400> 18

5

ES 2 536 796 T3

Met Thr Val Gly Tyr Asp Glu Glu Ile Pro Phe Glu Gln Val Arg Ala
 1 5 10 15

His Asn Lys Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly His Val Tyr
 20 25 30

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

ES 2 536 796 T3

Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Val Leu Tyr Glu Thr Tyr His Val
 50 55 60
 Arg Gly Val Ser Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Arg Ile Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Pro Asp Gly Gln Gly Gly Ala Asn Glu Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ser
 85 90 95
 Gly Leu Ser Ser Ala Ser Tyr Tyr Thr Trp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg
 100 105 110
 Val Met Arg Glu Arg Val Val Ala Arg Leu Lys Glu Arg Gly Lys Ala
 115 120 125
 Arg Arg Gly Gly Tyr Glu Leu Trp Ile Lys Ala Phe Leu Leu Leu Val
 130 135 140
 Gly Phe Trp Ser Ser Leu Tyr Trp Met Cys Thr Leu Asp Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Ala Ile Leu Ala Ala Met Ser Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val
 165 170 175
 Gly Thr Cys Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Ser
 180 185 190
 Arg Trp Val Asn Lys Val Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala
 195 200 205
 Ser Gly Met Thr Trp Glu Phe Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Leu Ile Glu Glu Glu Asn Gly Leu Gln Lys Val Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Lys Met Asp Thr Lys Leu Ala Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Pro Met Met Arg Leu His Pro Trp His Gln Lys Arg Trp
 260 265 270
 Tyr His Arg Phe Gln His Ile Tyr Gly Pro Phe Ile Phe Gly Phe Met
 275 280 285
 Thr Ile Asn Lys Val Val Thr Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu Phe Gln Ile Asp Ala Glu Cys Arg Tyr Ala Ser Pro Met Tyr
 305 310 315 320

ES 2 536 796 T3

Val Ala Arg Phe Trp Ile Met Lys Ala Leu Thr Val Leu Tyr Met Val
 325 330 335
 Ala Leu Pro Cys Tyr Met Gln Gly Pro Trp His Gly Leu Lys Leu Phe
 340 345 350
 Ala Ile Ala His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile
 355 360 365
 Val Asn His Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val
 370 375 380
 Lys Gly Thr Met Ala Pro Pro Lys Thr Met His Gly Val Thr Pro Met
 385 390 395 400
 Asn Asn Thr Arg Lys Glu Val Glu Ala Glu Ala Ser Lys Ser Gly Ala
 405 410 415
 Val Val Lys Ser Val Pro Leu Asp Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln
 420 425 430
 Thr Ser Val Asn Trp Ser Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser
 435 440 445
 Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Gly Leu Ser
 450 455 460
 His Glu Thr Tyr Tyr His Ile Gln Asp Val Val Gln Ser Thr Cys Ala
 465 470 475 480
 Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln His Glu Pro Ser Leu Trp Thr Ala Tyr
 485 490 495
 Trp Lys Met Leu Glu His Leu Arg Gln Leu Gly Asn Glu Glu Thr His
 500 505 510
 Glu Ser Trp Gln Arg Ala Ala
 515

<210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 19
 gcggccgcgc catggtggac ctcaagcctg g 31

<210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 20

gcggccgtta catcgctggg aactcgg 27

5 <210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 21
gcggccgcgc catgtcattg gctgctaaag atg 33

15 <210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 22
gcggccgtca atgacctgta actctaac 28

25 <210> 23
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 23
gcggccgcgc catggcgacg aaggaggcgt a 31

35 <210> 24
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 24
gcggccgcgt tacgtggact tggcttggc c 31

45 <210> 25
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

55 <400> 25
gcggccgcgc catggaggtc gtggagagat tc 32

60 <210> 26
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador
 <400> 26
 gcggccgcgt cactcagttt tagctccc 28
 5
 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 27
 15 gcggccgccca tggcgatcct gaaccggag 30
 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 28
 gcggccgcct agagcttggt cttgtagaag 30
 <210> 29
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 29
 gcggccgccca tggccgttc ttccggtgc 29
 <210> 30
 40 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 30
 gcggccgcct aaatctttt ggaaggaaag 30
 50 <210> 31
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 60 gcggccgcgc catgagcgcc tccggtgcgc tg 32
 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

5 <400> 32
gcggccgcgt tagtcaattt ttc 23

10 <210> 33
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 33
gcggccgcgc catgacggtc ggctacgacg ag 32

20 <210> 34
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 34
gcggccgcgt caggcagcgc gctgccagg 29

30 <210> 35
<211> 26755
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Plásmido

40 <400> 35

ctatacaaag ttgatagctt ggcgtaatcg atgtaccgat atcaatttaa attggccggc	60
cgagctccct gcagggggcc cggcgcgcct ctagattaat taaaggcctt agttactaat	120
cagtgatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaaacta tcagtgtttg acaggatata	180
ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt ttattagaat aatcgatat ttaaaagggc	240
gtgaaaagggt ttatccgttc gtccatttgt atgtcaatat ccatgataag tcgcgctgta	300
tgtgtttgtt tgaatattca tggaacgcag tggcggtttt catggcttgt tatgactgtt	360
tttttggggt acagtctatg cctcgggcat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc	420
gatgtttgat gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa	480
agttaaacat catgggtgaa gcggtcatcg ccgaggtgtc caccagctg tcggaagtcg	540
tgggtgtcat cgagcgccac ctcgaaccga ccctcctcgc cgtgcatctg tatggtagcg	600
ccgttgacgg cggccttaag ccccatcgg acatcgacct gcttgtcacc gttaccgtcc	660

ES 2 536 796 T3

gtctcgacga gaccacgcgc cgcgcgctta tcaacgacct tctggaaacg tccgcctccc	720
ccggcgagag cgaaatcctg cgcgcgggtg aggtgacgat tgtggtgcac gatgacatca	780
tcccttggcg ctatccggcc aaacgcgaac tccagttcgg cgaatggcag cgtaatgata	840
ttctggcggg tatctttgaa ccggccacca tcgacattga tctggcgatc ctgctcacca	900
agggccggga gcatagcgtg gccctcgtcg gccccgcggc cgaggaactt ttcgaccggg	960
tgccggaaca ggatctgttc gaagcactga acgagacgct gaccctgtgg aactccccgc	1020
cggattgggc gggcgatgag cgcaatgtgg tccttacgct gagccggatt tggtagctcg	1080
cggttaccgg caagatcgcg ccgaaggatg tcgccgccga ctgggcgatg gagcgcttc	1140
cggcgcaata ccagcccgtg atcctcgaag cgcgccaaag ctatctgggc caagaagaag	1200
accgtctcgc gtcccgggccc gaccagctcg aagaatttgt ccactatgtc aagggcgaga	1260
tcacgaaggt cgttggcaaa taatgtctag ctagaaattc gttcaagccg acgccgcttc	1320
gcggcgcggc ttaactcaag cgtagatgc actaagcaca taattgctca cagccaaact	1380
atcgatgagt tgaaggaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt	1440
ctgcgcgtaa tctgtgtctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg	1500
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata	1560
ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttagggcacc acttcaagaa ctctgtagca	1620
ccgcctacat acctcgtctt gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag	1680
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc	1740
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga	1800
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccc aaggggagaaa ggcggacagg	1860
tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac	1920
gcctggatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	1980
tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcc gcaacgcggc ctttttacgg	2040
ttcctggcct tttgttgcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct	2100
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc	2160
gagcgacgcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc tgatgcggta ttttctcctt	2220
acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata ggccgcgata ggccgacgcg aagcggcggg	2280
gcgtagggag cgcagcgacc gaagggtagg cgctttttgc agctcttcgg ctgtgcgctg	2340
gccagacagt tatgcacagg ccaggcgggt tttaagagtt ttaataagtt ttaaagagtt	2400
ttaggcggaa aaatcgcctt ttttctcttt tatatcagtc acttacatgt gtgaccggtt	2460
cccaatgtac ggctttgggt tccaatgta cgggttccgg ttcccaatgt acggctttgg	2520
gttcccaatg tacgtgctat ccacaggaaa gagacctttt cgaccttttt cccctgctag	2580
ggcaatttgc cctagcatct gctccgtaca ttaggaaccg gcggatgctt cgccctcgat	2640
caggttgcgg tagcgcatga ctaggatcgg gccagcctgc ccgcctcct ctttcaaadc	2700
gtactccggc aggtcatttg acccgatcag cttgcgcacg gtgaaacaga acttcttgaa	2760

ctctccggcg	ctgccactgc	gttcgtagat	cgtcttgaac	aaccatctgg	cttctgcctt	2820
gcctgcggcg	cggcgtgcca	ggcggtagag	aaaacggccg	atgccggggg	cgatcaaaaa	2880
gtaatcgggg	tgaaccgtca	gcacgtccgg	gttcttgcct	tctgtgatct	cgcggtacat	2940
ccaatcagca	agctcgatct	cgatgtactc	cggccgcccc	gtttcgctct	ttacgatctt	3000
gtagcggcta	atcaaggctt	caccctcgga	taccgtcacc	aggcggccgt	tcttggcctt	3060
cttggtagcg	tgcattggcaa	cgtgcgtggg	gtttaaccga	atgcagggtt	ctaccaggtc	3120
gtctttctgc	tttccgccat	cggctcgccg	gcagaacttg	agtacgtccg	caacgtgtgg	3180
acggaacacg	cggccggggc	tgtctccctt	cccttccccg	tatcggttca	tggattcggt	3240
tagatgggaa	accgccatca	gtaccaggtc	gtaatccac	acactggcca	tgccggcggg	3300
gcctgcggaa	acctctacgt	gcccgtctgg	aagctcgtag	cggatcacct	cgccagctcg	3360
tcggtcacgc	ttcgacagac	ggaaaacggc	cacgtccatg	atgctgcgac	tatcgcggtt	3420
gcccacgtca	tagagcatcg	gaacgaaaa	atctggttgc	tcgtcgccct	tgggcggctt	3480
cctaatacgac	ggcgcaccgg	ctgccggcgg	ttgccgggat	tctttgcgga	ttcgatcagc	3540
ggccccttgc	cacgattcac	cggggcggtg	ttctgcctcg	atgcgttgcc	gctgggcggc	3600
ctgcgcggcc	ttcaacttct	ccaccaggtc	atcaccagc	gccgcgccga	tttgtaccgg	3660
gccggatggt	ttgcgaccgc	tcacgccgat	tcctcgggct	tgggggttcc	agtgccattg	3720
cagggccggc	agacaacca	gccgcttacg	cctggccaac	cggccgttcc	tccacacatg	3780
gggcattcca	cggcgtcggt	gcctggttgt	tcttgatttt	ccatgccgcc	tcctttagcc	3840
gctaaaattc	atctactcat	ttattcattt	gtcattttac	tctggtagct	gcgcgatgta	3900
ttcagatagc	agctcggtaa	tggctttgcc	ttggcggtacc	gcgtacatct	tcagcttggg	3960
gtgatcctcc	gccggcaact	gaaagttgac	ccgcttcacg	gctggcggtg	ctgccaggct	4020
ggccaacggt	gcagccttgc	tgctgcgtgc	gctcggacgg	cgggcactta	gcgtgtttgt	4080
gcttttgctc	atcttctctt	tacctatta	actcaaata	gttttgattt	aatttcagcg	4140
gccagcgctt	ggacctcgcg	ggcagcgctg	ccctcggggt	ctgattcaag	aacggttgtg	4200
ccggcggcgg	cagtgcctgg	gtagctcacg	cgtgcgtga	tacgggactc	agaatgggc	4260
agctcgtacc	cggccagcgc	ctcggcaacc	tcaccgccga	tgcgcggtcc	tttgatcgcc	4320
cgcgacacga	caaaggccgc	ttgtagcctt	ccatccgtga	cctcaatgcg	ctgcttaacc	4380
agctccacca	ggtcggcggg	ggcccaaatg	tcgtaagggc	ttggctgcac	cggaatcagc	4440
acgaagtcgg	ctgccttgat	cgcggacaca	gccaaagtcc	cgcctggggg	cgctccgtcg	4500
atcactacga	agtcgcgccg	gccgatggcc	ttcacgtcgc	ggtcaatcgt	cgggcggctg	4560
atgccgacaa	cggttagcgg	ttgatcttcc	cgcacggccg	cccaatcgcg	ggcactgccc	4620
tggggatcgg	aatcgactaa	cagaacatcg	gccccggcga	gttgaggggc	gcgggctaga	4680
tgggttgcca	tggtcgtctt	gcctgacccg	cctttctggg	taagtacagc	gataaccttc	4740
atgcgttccc	cttgcgtatt	tgtttattta	ctcatcgcat	catatacgca	gcgaccgcat	4800

gacgcaagct	gttttactca	aatacacatc	accttttttag	atgatcagtg	attttgtgcc	4860
gagctgccgg	tcggggagct	gttggttggc	tggtggcagg	atatattgtg	gtgtaaacaa	4920
attgacgctt	agacaactta	ataacacatt	gcggacgtct	ttaatgtact	gaatttagtt	4980
actgatcact	gattaagtac	tgcgatcgcc	tcgacatatt	gtttttgttt	cacataaatg	5040
tcgttttgga	ttattcatgt	aatatittta	actaaagtac	aatttttgac	tacttttagtt	5100
tactagttaa	gctttttatt	ttttgactaa	ccattgaatg	atgaagagat	caacgcatca	5160
tatttacaac	ttacatagtc	ttttggaagt	gtaaattgct	aatactacct	aaaatatatc	5220
tataattaac	taatattttt	tcgtcaatta	taatagatca	attaaaaggc	tatcaaaagg	5280
aaaaaaatga	aatccacatc	ctgccatcat	aacctcatgc	tggaaaaaga	aatgaaaaaa	5340
tataaaaaat	ttcttttggt	tattaaattt	acaactttta	tactagtttc	ttttctattt	5400
tttaaaagct	tttgtcactt	acttaaaaaa	aaaaaacttt	ttgaaatatt	cctacttcca	5460
atgtctgatt	agtgttctg	gatttccttt	ttggatcatg	tgaatcctaa	atcagaaaaa	5520
ttcatataat	acccaattca	gtatattttc	atacttcaat	ttacaagagt	tctctatggt	5580
tttagcttct	ttcttttaag	ccaaatgttt	taagcatctt	ttatacatta	aaataattta	5640
gtgttgagtt	gagatttttt	tttttttttt	ttggatttac	ttgttcaaaa	tctgaaaaaa	5700
tgtttacaga	aggttaaaat	gaaccaaaaag	gcatatcaag	ctagattttg	aattacccta	5760
tttcatcgta	tacacaaaac	tgataatgtg	gacacagttg	attttacttc	tcgatgacat	5820
cgtagtttta	tttaatttgg	aaaccacggc	ccatatgagc	acatttcaat	taaaaaccaa	5880
tggtaaagagc	attttccatg	caagattcga	gagatattaa	cccagtgact	gttaaaacag	5940
cttagaacc	taataacgaa	tttcaattac	tcaatttacc	attcgcattt	cgcaataacc	6000
aaactgagcc	agtcacaagg	agtaaaccga	accggattat	ttattttata	aatgaaagaa	6060
aggaaaccaa	acaacaacag	cagtagtagt	ctgacgtaaa	ccaaaaagca	ggcagatcaa	6120
caactaaaag	aaactcaaat	tacaaaaaca	aacaggaaat	tgcaaaacta	gtttttttac	6180
catatgcata	caaagaccat	aaaaggttct	gataatcacc	ggtttcatct	cgctgagatt	6240
accctgttat	ccctatcagt	atttaatccg	gccatctcct	tccgttatga	catcgttgaa	6300
agtgccacca	ttcgggatca	tcggcaacac	atgttcttgg	tcgggacaaa	tcacatccaa	6360
caggtaaagg	cctggtgtat	ccagcattgt	ctgaatagct	tctcggagat	ctgctttctt	6420
tgtcacccct	gccgctggaa	tcccgaagc	tgctgcaaac	agcaacatgt	tcgggaatat	6480
ctcgtcctcc	tgagccggat	ccccgagaaa	tgtgtgagct	cggttagctt	tgtagaaccg	6540
atcttcccat	tgcataacca	tgccaagatg	ctggttggtt	aataaaaagta	ccttcactgg	6600
aagattctct	acacgaatag	tggctagctc	ttgcacattc	attataaagc	ttccatctcc	6660
gtcaatatcc	acaactatcg	catcagggtt	agcaacagac	gctccaatcg	cagcaggaag	6720
tccaaatccc	atagctccaa	ggcctcctga	tgatagccac	tgcttggtt	tcttgtaatt	6780
gtagaactgc	gccgcccaca	tttgatgttg	cccgaacca	gtacttatta	tggtttttcc	6840
atcagtcaac	tcataagga	ccttaatcgc	atactgtgga	ggaatagctt	ccccaaacgt	6900

cttaaagctc	aacggaaaact	tctgtttctg	tacgttcaac	tcattcctcc	aaactccaaa	6960
atcaagctta	agtcctccg	ctcggttctc	agaacctta	ttcatccctt	gcaaagccag	7020
cttaacatca	ccacacacag	acacatgagg	agtccttattc	ttcccaatct	cagccgagtc	7080
aatatcaata	tgaacaatct	tagccctact	agcaaaagcc	tcaagcttac	ccgtgacacg	7140
atcatcaaac	cttaccctcaa	acgccaacaa	caaataccta	tgctccacag	cgtaatttgc	7200
atacacagtc	ccatgcattc	caagcatatg	taacgacaac	tcatcatcac	aaggataaga	7260
tcccagcccc	atcaacgtac	tcgcaacagg	gatccccgta	agctcaacaa	acctaccctaa	7320
ttcatcgcta	gaattcaaac	aaccaccacc	aacatacaac	acaggcttct	tagactcaga	7380
aatcaaccta	acaatctgct	ccaaatgaga	atcttccgga	ggtttaggca	tcctagacat	7440
ataaccaggt	aatctcatag	cctgttccca	attaggaatc	gcaagctggt	gttgaatatc	7500
tttaggaaca	tcaacccaaa	cagggtccagg	tctaccagaa	gtagctaaaa	agaaagcttc	7560
ctcaataatc	ctagggatat	cttcaacatc	catcacaaga	tagttatgct	tcgtaatcga	7620
acgcgttacc	tcaacaatcg	gagtctcttg	aaacgcatct	gtaccaatca	tacgacgagg	7680
gacttgctct	gtgattgcta	caagaggaac	actatctaac	aacgcatcgg	ctaataccgct	7740
aacgagattt	gtagctccgg	gacctgaagt	ggctatacag	atacctgggt	tacctgagga	7800
tcgagcgat	ccttctgctg	cgaatacacc	tccttggttcg	tgacgaggaa	ggacgttacg	7860
gattgaggaa	gagcgggtta	aggcttggtg	aatctccatt	gatgtacctc	cagggttaagc	7920
gaatacgggt	tctacgcctt	gacgttctaa	agcttcgacg	aggatatcag	cgcctttgcg	7980
gggttgatct	ggagcgaatc	gggagatgaa	tgtttcgggt	ttggtagggt	tggttgagaa	8040
gggagtgggt	gtgacattgg	tggttggtgt	gagcacggcg	gagatggagg	aggagagact	8100
ggatttgata	ccgcggcggc	gggaggagga	ggatgatttg	ttgggggtta	gggagaatgg	8160
gaggagagaat	ctggagattg	gtaatggtga	tttgaggagg	gaaggagatg	gtttggtgga	8220
gaaggagatc	gaagaagatg	ttgttggtgt	tggttggtgcc	gccgccatgg	ttcagctgca	8280
catacataac	atatcaagat	cagaacacac	atatacacac	acaaatacaa	tcaagtcaac	8340
aactccaaaa	agtccagatc	tacatatata	catacgtaaa	taacaaaatc	atgtaaataa	8400
tcacaatcat	gtaatccaga	tctatgcaca	tatatatata	cacaattaat	aaaaaaaaatg	8460
atataacaga	tctatatcta	tgtatgtaac	aacacaatca	gatgagagaa	gtgatgtttt	8520
cagatctgta	tacatacaaa	cacaaacaga	tgaacaattg	atacgtagat	ccatatgtat	8580
acgtacaatt	agctacacga	ttaaataaaa	aaaatcaacg	atttcggatt	ggtacacaca	8640
aacgcaacaa	tatgaagaaa	ttcatatctg	attagatata	aacataacca	cgtgtagata	8700
cacagtcaaa	tcaacaaatt	tatagcttct	aaacggatga	gatgaacaag	ataaagatat	8760
tcacataagg	catacataag	ataagcagat	taacaaacta	gcaataatac	atacctaatt	8820
aaaacaagga	ataacagaga	gagagagaga	gagagagatt	taccttgaaa	atgaagagga	8880
gaagagagga	tttcttaaaa	ttgggggtag	agaaagaaag	atgatgaatt	gtgagaaagg	8940

agagatagaa	gggggggttg	tatatatagg	ctgtagaaga	ttatTTTTgt	gtttgaggcg	9000
gtgaaggaag	aggggatctg	actatgacac	gtttgcggtt	acgtatttcg	ataggagtct	9060
ttcaacgctt	aacgccgtta	ctctatatga	ccgtttgggc	cgtaacgggg	ccgtttgtta	9120
acgctgatgt	tgattctttt	ctttctttct	ttcttccttt	tttaaagaag	caattgtaca	9180
atcgttgcta	gctgtcaaac	ggataattcg	gatacggata	tgccatatatt	catatccgta	9240
atTTTTggat	tcgaattttc	ccctctaggg	ataacagggg	aatggatcta	tattgttttt	9300
gtttcacata	aatgtcgttt	tggattattc	atgtaatat	ttaaactaaa	gtacaatttt	9360
tgactacttt	agtttactag	ttaagctttt	atTTTTttga	ctaaccattg	aatgatgaag	9420
agatcaacgc	atcatattta	caacttacat	agtcttttgg	aagtgtaaat	tgctaatact	9480
acctaaaata	tatctataat	taactaatat	tttttcgtca	attataatag	atcaattaaa	9540
aggctatcaa	aaggaaaaaa	atgaaatcca	catcctgcc	tcataacctc	atgctggaaa	9600
aagaaatgaa	aaaatataaa	aaatttcttt	tgtttattaa	atttacaact	ttaatactag	9660
tttcttttct	atTTTTtaaa	agcttttgtc	acttacttaa	aaaaaaaaaa	ctttttgaaa	9720
tattcctact	tccaatgtct	gattagtgtc	tctggatttc	ctttttggat	catgtgaatc	9780
ctaaatcaga	aaaattcata	taatacccaa	ttcagtatat	tttcatactt	caattttaca	9840
gagttctcta	tgTTTTtagc	ttctttcttt	taagccaaat	gttttaagca	tctttttatac	9900
attaaaataa	tttagtggtg	agttgagatt	tttttttttt	ttttttggat	ttacttgttc	9960
aaaatctgaa	aaaatgttta	cagaaggtta	aatgaacca	aaaggcatat	caagctagat	10020
tttgaattac	cctattttcat	cgtatacaca	aaactgataa	tgtggacaca	gttgatttta	10080
cttctcgatg	acatcgtagt	tttatttaat	ttggaaacca	cggcccatat	gagcacattt	10140
caattaaaaa	ccaatggtaa	gagcattttc	catgcaagat	tcgagagata	ttaacccagt	10200
gactgttaaa	acagcttaga	accctaataa	cgaatttcaa	ttactcaatt	taccattcgc	10260
atttcgcaat	aaccaaactg	agccagtcac	aaggagtaaa	ccgaaccgga	ttattttattt	10320
ataaaatgaa	agaaaggaaa	caaacaaca	acagcagtag	tagtctgacg	taaacaaaaa	10380
agcaggcaga	tcaacaacta	aaagaaactc	aaattaccaa	aacaaacagg	aaattgcaaa	10440
ctaagttttt	ttaccatatg	catacaaaga	ccataaaagg	ttctgataat	caccggtttc	10500
atctcagatc	cgcgatcgcc	aattgacgcg	tactagtgtg	caagcttgcg	gccgcgaatt	10560
cggtagatcc	ggccagtga	ttatcaacta	tgtataataa	agttgggtac	cggcctatta	10620
ggccacggtc	cgtacagtgt	ttgccacaat	cagtaaattg	aacggagaat	attattcata	10680
aaaatacgat	agtaacgggt	gatataattca	ttagaatgaa	ccgaaaccgg	cggtgaaggat	10740
ctgagctaca	catgctcagg	tttttttaca	cgtgcacaac	agaattgaaa	gcaaatatca	10800
tgcgatcata	ggcgtctcgc	atatctcatt	aaagcagcaa	tcaattatta	attaatcaat	10860
gacctgtaac	tctaacagcc	gcagactccc	tagtcgttaa	tccctcgttt	ctctgatgaa	10920
gggaatgaga	tgcatttccc	acagccaaga	gattcacgta	tgtatcacgc	attgacttcg	10980
cgtaagttct	gacatcgtag	tctacgccat	gttttttcaa	caattgtttc	actcttccgc	11040

agatttttagg	atggttatat	tgtggcatgc	tagggaaaag	gtgatgttca	atttgaaaat	11100
tcagataggc	catccaccaa	ttgactagag	gtgtgttaga	ttgattagt	gtatggtttg	11160
cagaatacaa	ggtccaagaa	atatgcttat	cgtgtggaac	aacatcctta	tgtgtgtgag	11220
acaccgcaaa	gttcgtgaag	atatatgtac	ctccgactgc	cacataaaaa	gcgtacaatc	11280
tgaagcacc	accaagccca	agatgaccga	atgctgcata	ccataaagca	tatcgtaaag	11340
ccatatagcc	taattcgagt	tggtttccta	ctctcaatgc	gtgctttgga	tgttggaacga	11400
actgccaacc	aaaagatacc	agggttgtga	taacgcctcc	aaagaaaagt	ggagcttgcc	11460
atgctagcca	cgactttcct	gctcccctag	ccttagcacc	gatgagtcca	tggaacgcaa	11520
ccagaggcat	tgtttgaagg	tctggatctg	cacccaactt	ttgcggtgtc	gcatgggtgct	11580
tgttatgttg	gtttctccaa	taacaaccgg	acattccgca	acctaatacca	tagataatca	11640
tttgcatgtg	tcgatcaagt	ttaataattac	ctgtgagcga	ataatgacca	ccctcatgct	11700
gaagccaacc	gcatctcccc	tgagctattc	ctgctacaat	ggctcctaaa	aaccaataac	11760
ccgcccagat	aagtctaata	cccgcccagt	acatagcaac	gacttccgca	actcgataag	11820
ctacatgcca	cagattcggt	tcgaagtaac	cttcggcctc	gagttgggct	ctcagggcct	11880
cgaagtctgc	agacaaagcg	tctctagcga	atccatccgc	tactggccta	cttggcaaag	11940
ctctcaacat	tttatccgct	tttttagacc	taatatggaa	gttggtataa	gcgtctgttg	12000
catcagaacc	taaggagagt	ttaataatgc	ttcctcccgg	gtgcctttta	ataaaatcag	12060
agacatcata	cacacgaccc	cttatgatca	tctccttaga	agtgtcgata	gaactaactg	12120
taaggctctgc	tgcattcagt	cttgacttat	ttgtagctcc	gtgatactta	gggtccaaga	12180
cggatgagtg	ggccgaggct	gcatcttttag	cagccaatga	catggaaggc	gcggagggtg	12240
gagagtgagt	tgtgagttgt	gtggtggggt	tgggtgagatt	ggggatgggtg	ggtttatata	12300
gtggagactg	aggaatgggg	tcgtgagtg	taactttgca	tgggctacac	gtgggttctt	12360
ttgggcttac	acgtagtatt	attcatgcaa	atgcagccaa	tacatatagc	gtattttaat	12420
aatgtgtggg	aatacaatat	gccgagtatt	ttactaat	tggcaatgac	aagtgtacat	12480
ttggattatc	ttacttggcc	tctcttgctt	taatttggat	tatttttatt	ctcttacctt	12540
ggccgttcat	attcacatcc	ctaaaggcaa	gacagaattg	aatggtggcc	aaaaattaaa	12600
acgatggata	tgacctacat	agtgtaggat	caattaacgt	cgaaggaaaa	tactgattct	12660
attaggggtg	agagttgatc	ggttaattat	ccaatacatg	ccgttggtta	attaggatta	12720
tataaaaaat	cgatcatcta	ttagaatcga	ttacggttaa	atagggtataa	aaatggagag	12780
aattgaatca	gttataaaat	tgttttcagt	taaaatat	ctatgatctt	caatcgattt	12840
cggatatttta	tactcaacat	ggaaaaaatt	tcaaatgtat	ttcttctaaa	agcaaaagaa	12900
tctataaaaa	ctatcatttt	atccaaaaca	ccaaaatagt	cttttacaat	cttttacagc	12960
cttcacataa	acgaaaacaa	aagtgaacaa	tttcttttta	cagcctttac	acaaaaaaga	13020
ctacgatgaa	ctatgataaa	atttcataat	ctaaaaacat	taatgaggta	aagactctct	13080

caa atgggat	attcttcgaa	aattttcata	atcgaacgat	atacttgaat	ttgcaactca	13140
tgaccgaaat	tgtcccaatc	cataatactc	tttgacaccc	tatcagatcc	caacgttgtc	13200
cctggtttcg	aaaccaccat	ttcaaacatg	aacatatcac	aaaataaaca	tttagacacc	13260
aaatatctgc	taatggccgg	cctaacctgc	aggatacaag	tgcgcacaga	ctagcggccg	13320
cta atcccgg	gaattaccgg	tagtaggcgc	cttgtttttag	actgaatata	acacaacgat	13380
tatatagccg	ctgtctttgt	ttgaagagaa	tggactacat	gctgaaaaat	agt gatacaa	13440
gaatcgttgt	ttta atgcta	aaatgaccat	ctcgtgattt	aacttttctg	gaccaatgat	13500
tgtaaagttt	tttttagaga	ggtggtgata	aacatatatt	gatttttgaa	atgaatagag	13560
ttagaaagta	agaaaaatac	aataaaaaatg	ttaaataatg	ttgtagaaat	agaaatggaa	13620
gagaagtgtg	aagaaattta	aataaaaaatt	agatggggaga	gtaagttagt	ttatattgat	13680
ttgttttgtg	gttagtttat	ctatgttata	cttttaactt	ataataatcc	tttccatcat	13740
taagcaattt	ttaaaaatga	cataatttta	aaattatgaa	gtaataattg	gcatggtgaa	13800
ta atagacag	tgtaa atggt	gtaaatatat	gagctcccat	tttatttatt	gctcccattt	13860
tattttattt	agtttgtgtg	acagatgaac	attatttagga	ggaaagggtat	aagcagggtt	13920
taactgtcac	agggaaagggtg	gttttgggag	tcttagttaa	ttaatcagat	cttcttagaa	13980
gggaaaagct	catcatcagt	ctggtagtac	acgatatctc	cgttatcaga	cacgtagtga	14040
tcccttccaa	gagacttcaa	aagagcaggg	ataagatgaa	gaggcacagg	tccagacttt	14100
ctaggctcac	ggtagtagtt	tccaacaccc	ctcttagcct	ctctagtagc	ctcaacaagg	14160
tggtagtgag	gaatctgagg	gaaaagggtga	tggatcacgt	gagttccaat	atcgtgggtg	14220
atcttgttga	agaatccgta	atcctgatcc	acagtagtaa	gtcctcctct	aaggtaagac	14280
cactcctttg	acctgtacca	aggaagcttc	ttatcgtatc	cgtaggtggtg	aaggtaagtc	14340
acagtatcaa	gccacatcac	gaaaataaagg	taaggcactc	cgtaaagctt	gaacatcatg	14400
ttaggacca	cgatagtaga	agcgtaaaga	agaaacactc	ccatagcagc	ccaacacata	14460
gtagaagtca	cgataagtcc	cctctcgta	ggcttgaaaa	gatcagagta	agggttgaag	14520
tgagatccag	tctttccagg	agatctgtac	caaaggtaaa	gagggttaagc	gaacataggg	14580
aaagggatct	tgtacctaa	gaacttagta	gagaaatcaa	gcttcttgta	aaggttctca	14640
ggaagtggaa	ccaagactc	atccttctca	acgtgtccat	ggttctgatg	gtgagtccta	14700
tgagagattc	tccatccgtg	gtaaggcaca	aggatagaag	agtgaagaac	gtgtcccaca	14760
acgttggtta	gagtagtggt	atcagagaaa	gatccgtgtc	cacaatcgtg	tccaagaacg	14820
aaaagagccc	agaacatagt	tccctgagca	atccagtaaa	caggccagaa	agccaagag	14880
ttaatgtaca	cagcagcagc	aagaagagcg	aaaacagcag	caacatccca	cacaacgtaa	14940
gaaagactcc	tccaagggtt	cttaaccag	caatgagcag	gaatagcagc	cctgatatca	15000
gcgatcttga	aaggaggagg	agcagcagga	tcaaacttat	cagcagctct	ctttccaatt	15060
ccctcg tact	gttgctgtcc	atcgaaaaact	tctccatcag	ctccagactt	agaaagccta	15120
gctccagaag	aaacagccat	ggtggatccg	gcgcgccggt	catgcattca	tgcat taacc	15180

atcactctct	tctctatttta	tacaacaaca	aatgcaaaat	ctttccaact	tttttctttc	15240
atthttattat	tcaactccaa	attaacaatt	attaaacaac	gatggcaatg	catccacgtc	15300
atcaaaaaag	tatatgaaat	aattagttta	aatttaaata	gatattttatg	gagagaagcg	15360
gtttggcagg	tagcaatggg	aagtgagagg	agtgctgagg	tggcagtgtg	catggccagt	15420
aggctcataa	tgagaagagg	tgggagctga	ggtggcagca	tgcattgcca	gtggtgtcat	15480
catgggaaga	ggaaggagct	cacgtggcaa	catgcatggc	gagttgtgtc	atagtgaaaa	15540
aaccaaagtc	gaaagtgaca	tgagacatgt	gtggagagga	gggagctgag	gtggcagcgt	15600
gcatggtgag	ttgtgtcatg	tggggaatct	aaaattctaa	tttgattttc	ccttttttat	15660
ttaattgtat	atattatata	tattccctag	tttatcctta	tttattttac	tctgtttgtga	15720
actacaatga	ttgtactaca	tacatgacta	aatgatcaca	cagggtgtgag	aggatctgaa	15780
tgactttaga	atgttttttt	aaaattatat	tttttaaata	tttgattttc	tataaactct	15840
aatcatgtat	tagaatgttt	tgaaaaactc	taagttttta	caaaaatata	tgtataacat	15900
atattgttat	aattagatgt	atthttgtgt	gtgttatatt	taatgatatc	aaaacatttc	15960
atccttatga	taacctgacg	gtagtgggtt	tattgtgttt	ctcgtgtgta	cttttttttg	16020
tttaattcta	acttcaagac	ttaactaaaa	gtttctaata	agatgtttta	caaaattgtt	16080
ttcttgaaat	cttgtctctg	agtgggtgctc	atgactagaa	aacctaat	caattattat	16140
attaaaagtt	taagtctctt	atattattat	tacagaaaca	aagagataag	gacatttttt	16200
ttaatctttt	ttcttcctta	ccttccttaa	tctcaaatga	aacataaatt	tgthttgtta	16260
actgttgccc	ctttgtctgg	tgatgaggaa	ataacacatt	ttctatagaa	ggatcctggc	16320
cggcctagta	gatttaaatt	ggccttagtg	gccaaacttg	gcgtaatcat	ggccactttg	16380
tacaagaaag	ctgggtggta	ccggcctatt	aggccacggt	ccgtacagtg	tttgccattg	16440
atgcatgttg	tcaatcaatt	ggcaagtcatt	aaaatgcatt	aaaaaatatt	ttcatactca	16500
actacaaatc	catgagtata	actataatta	taaagcaatg	attagaatct	gacaaggatt	16560
ctggaaaatt	acataaagga	aagttcataa	atgtctaaaa	cacaagagga	catacttgta	16620
ttcagtaaca	tttgagctt	ttctaggtct	gaaaatatat	ttgttgccct	gtgaataagc	16680
ataatggtac	aactacaagt	gttttactcc	tcatattaac	ttcggtcatt	agaggccacg	16740
atthgacaca	tttttactca	aaacaaaatg	tttgcatatc	tcttataatt	tcaaattcaa	16800
cacacaacaa	ataagagaaa	aaacaaataa	tattaatttg	agaatgaaca	aaaggaccat	16860
atcattcatt	aactcttctc	catccatttc	catttcacag	ttcgatagcg	aaaaccgaat	16920
aaaaaacaca	gtaaattaca	agcacaacaa	atggtacaag	aaaaacagtt	ttcccaatgc	16980
cataatactc	gaaccaatca	attattaatt	aactagagct	tgthtttgta	gaacaccacc	17040
tttccatcat	cctcaacgaa	cttgcaatgg	gtgtaagatc	tccagagagc	aacaggaaca	17100
ggagtgggtat	ccttcaagta	gaactttccg	aggagaggct	taatagcgth	ggtagcctcc	17160
tcgcaatgat	agaaaggcat	cttggaagaag	atgtggtggc	aaacatgggt	atccacgatt	17220

ctatgcacca	cagaatcgag	gaatggacca	aatgatctat	ccacagtgca	caaagctcct	17280
ctcaaccaat	tccactctcc	ctctctgaaa	tgagggatgt	aggtatcggg	gtgttgagg	17340
taggtaatca	acaccaagta	agcggtcaca	atgaagtaag	gcaccacgta	gaacttcacc	17400
atggtggtga	aggagaaagt	gtgcacaaa	gcagccaaaa	cagccaacat	agccaccaag	17460
aaaatatcgg	agagcacgat	catccatctc	tccctatcag	catagatagc	ggagtaaggg	17520
ttgaagtga	acctagactt	tccccagtac	ttagtaggtc	cagtagcggt	gaagaagagg	17580
tatccaggca	tccatccaac	aaccaacatg	tacacgatac	ggtagagttg	gtagagagga	17640
gaatcctcca	aggtctcggt	ccaagaagaa	gccaacacag	atctgggtcac	aggaacgaaa	17700
acctcatcgt	tctcgcaaga	tccagtgttg	gaatgggtgt	ttctgtgaga	gattctccaa	17760
gagtggtaag	gcaccaacaa	agcagaatgc	aacacgagtc	caatcaagtt	gttcaccacc	17820
tcagaagagc	aataagcctg	atgtccacac	tcattgagcga	taaccacac	tccagtcaag	17880
taagatccct	ggaagaacca	gtacacaggc	cacaaaacat	aagcagcagc	tccagctcta	17940
tcaatgaagg	tagcagcgta	gaacaaagca	gcgcaagtca	acacgttctt	gatcatgtag	18000
taggtggagg	tcacgaaaga	tctctcgaag	cagtgccttag	gaatagcagc	tctgagatct	18060
ctgagagaga	aatgaggcaa	ctccaaaggc	aaaggagcag	gagcacctc	aacatgagtg	18120
tatccagcct	cagccaattg	tctttgctta	gcctcagaat	cagtagcgag	gttagcagca	18180
gaatcagcct	caggggttcaa	aatagccatg	gcggatccgg	cgcggtgttt	ttaatcttgt	18240
ttgtattgat	gagttttggt	ttgagtaaag	agtgaagccg	atgagttaat	ttataggcta	18300
taaaggagat	ttgcatggcg	atcacgtgta	ataatgcatg	cacgcatgtg	attgtatgtg	18360
tgtgctgtga	gagagaagct	cttaggtgtt	tgaaggaggt	gacaagtggc	gaagaaaaac	18420
aattctccgc	ggctgcatgc	tatgtgtaac	gtgtagctaa	tggtctggca	tggcatctta	18480
tgaacgattc	tttttaaaaa	caaggtaaaa	acttaacttc	ataaaattaa	aaaaaaaaacg	18540
tttactaagt	tggttttaaaa	ggggatgaga	gtctataaat	tttgagggta	gtgccgttgg	18600
gaatataaat	tgggagctta	atcagaatta	tagaagttaa	agttgattta	gtcacgggtca	18660
atataaattg	ggaatttgag	tcaaaatctt	ccaaattcgg	aatccgtctt	gttacacccg	18720
gtggatagga	gccgaacggg	ttgaaaatac	ttgaaatgtg	gatgcagggtg	caggctgggt	18780
taatttttatg	ttgaatggat	acatgtcaat	cgaatttgag	ttataggtac	acattttact	18840
ctgatactaa	aatgtaacat	ttgtctcaag	aatgggtagg	tcattccttat	ggccggccta	18900
acctgcagga	tacaagtgcg	cacagactag	cggccgctaa	tcccgggaat	taccggtagt	18960
aggcgccatt	gatgcatgtt	gtcaatcaat	tggcaagtca	taaaatgcat	taaaaaatat	19020
tttcatactc	aactacaaat	ccatgagtat	aactataatt	ataaagcaat	gattagaatc	19080
tgacaaggat	tctggaaaaat	tacataaagg	aaagttcata	aatgtctaaa	acacaagagg	19140
acatacttgt	attcagtaac	atttgagct	tttctaggtc	tgaaaatata	tttgttgcct	19200
agtgaataag	cataatggta	caactacaag	tgttttactc	ctcatattaa	cttcgggtcat	19260
tagaggccac	gatttgacac	atttttactc	aaaacaaaat	gtttgcatat	ctcttataat	19320

ttcaaattca	acacacaaca	aataagagaa	aaaacaaata	atattaattt	gagaatgaac	19380
aaaaggacca	tatcattcat	taactcttct	ccatccattt	ccatttcaca	gttcgatagc	19440
gaaaaccgaa	taaaaaacac	agtaaattac	aagcacaaca	aatggtacaa	gaaaaacagt	19500
tttcccaatg	ccataatact	cgaactcagg	tagacttggt	cttagcagca	gcttcagtag	19560
cagccttagc	ctccttcaaa	gtgaagagct	tagcctcttg	atcaaccact	ccgtagttag	19620
catacaacct	tcccactctg	aagaaagcct	tgatgattgg	ctcatcggac	tttctcacia	19680
gctctgggaa	agcttggtgg	aaagcagcag	tagccttctt	gagcttgtag	tgtgggataa	19740
ttgggaagag	gtggtggatc	tggtgagttc	cgatgttggt	ggagagggtta	tcgatgagag	19800
caccgtaaga	tctatccaca	gaggacaagt	ttcccttcac	gtaagtccac	tcagaatcag	19860
cataccatgg	agtctcctca	tcgttggtgg	gcaagaaggt	ggtaatcacc	aacatagatc	19920
cgaacacgaa	aactggtccg	tagtagtaga	tagccatggt	cttaagtccc	aactggagag	19980
acaagtagat	agagagtcca	gcaacgaaga	agtgagcgag	caaagagata	accacagcgg	20040
acacttgctc	cacaaaaagt	ggctcgaatg	ggttgaagtg	gttcaccttt	cttggtggga	20100
atccctccac	caaataagca	agccaagcag	ctcccaaagc	caagatcaag	ttcctggaca	20160
atgggtgatc	atcagccttt	ctctgtgggt	agaacacctc	atctctatcg	atgtttccgg	20220
tgttcttggt	gtggtgtctg	tgggtcaact	tccaagactc	gaatgggggtc	aagatgagag	20280
agtgcagtaa	ggttcccaca	acgaagttca	agaggtggta	tctagagaaa	gctccgtgtc	20340
cagcatcgtg	tccaacagtg	aagaatcccc	agaacacaat	tccctggagg	aggatatatc	20400
cagtgcacaa	agcagcatcc	aaagcccaga	aagactcaac	ctctggcaaa	gctctagcgt	20460
agttcaatcc	gaagggtcaaa	gccacagcaa	taaccaagca	tctcacagtg	tagtagagag	20520
acaaaggcac	agaagcctcg	aagcaatcct	ttgggagaga	tctcttgatc	tcggtgagag	20580
ttgggaaaac	gtaagcctcc	tttgtagcca	tgggtgtttt	taatcttggt	tgtattgatg	20640
agttttgggt	tgagtaaaga	gtgaagccga	tgagtttaatt	tataggctat	aaaggagatt	20700
tgcatggcga	tcacgtgtaa	taatgcatgc	acgcatgtga	ttgtatgtgt	gtgctgtgag	20760
agagaagctc	ttaggtgttt	gaagggagtg	acaagtggcg	aagaaaaaca	attctccgcg	20820
gctgcatgct	atgtgtaacg	tgtagctaata	gttctggcat	ggcatcttat	gaacgattct	20880
ttttaaaaac	aaggtaaaaa	cttaacttca	taaaattaaa	aaaaaaacgt	ttactaagtt	20940
ggtttaaaaag	gggatgagag	tctataaatt	ttggaggtag	tgccgttggg	aatataaatt	21000
gggagcttaa	tcagaattat	agaagttaaa	gttgatttag	tcacggtcaa	tataaattgg	21060
gaatttgagt	caaaatcttc	caaattcgga	atccgtcttg	ttacacccgg	tggataggag	21120
ccgaacgggt	tgaataatact	tgaatgtgg	atgcaggtgc	aggctggttt	aattttatgt	21180
tgaatggata	catgtcaatc	gaatttgagt	tataggtaca	cattttactc	tgatactaaa	21240
atgtaacatt	tgtctcaaga	atgggtaggt	catccttatg	gccggcctag	tagatttaaa	21300
ttggccttag	tggccaagct	tggcgtaatc	atggagcctg	cttttttgta	caaacttggg	21360

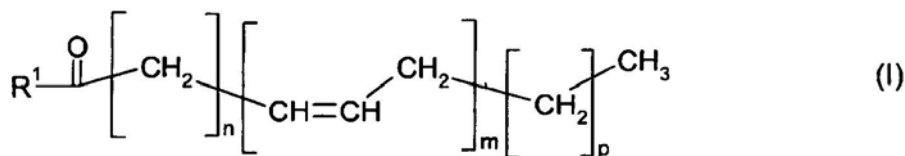
taccggccta	ttaggccacg	gtccgtacag	tgtttgcccc	ccactccgcc	ctacactcgt	21420
atatatatgc	ctaaacctgc	cccgttcctc	atatgtgata	ttattatttc	attattaggt	21480
ataagatagt	aaacgataag	gaaagacaat	ttattgagaa	agccatgcta	aaatatagat	21540
agatatacct	tagcaggtgt	ttattttaca	acataacata	acatagtagc	tagccagcag	21600
gcaggctaaa	acatagtata	gtctatctgc	agggggtacg	gtcgaggcgg	ccttaattaa	21660
ttatcaagcg	gtctttccag	aatgttggtc	gtgcacgtag	tagtgctttc	ccacattatc	21720
gaggtttccc	aaagtagcct	tccaagctcc	agcataagtc	atcaccttgt	agttgaggtt	21780
ccacttctta	gcgaaagcaa	cgaatcttct	ggacacctca	ggttggtctga	attgaggcat	21840
agaaggggaag	aggtgatgaa	tcacttggtc	gttcaagtat	cccatcaacc	agttaacca	21900
tccctgagaa	ggatcgatat	caatggtgtg	atccacagcg	tacctaacc	aagacaaatg	21960
ctcatcagca	ggaacaacat	ccaaatgggt	gtgagaagta	gagaagttag	cgaacaagta	22020
gcatccggaa	acccaagaag	tagccaagaa	gagtccttag	gattgcatag	cgggtgaatcc	22080
agtaacagcc	ttaatgggtc	aggttcta	cacatgagca	gccaacatcc	acacaagctc	22140
ctcgtacttt	cctcccttca	aagccttaga	aggatggagg	aagaacatcc	agaagagcaa	22200
caccaatcca	gaagtcacag	gaatgaaggt	ccaagcttgc	aatctgagcc	agtacttaga	22260
gaatccccta	ggtctattat	cctccacagc	ggtggtgaag	aaagcaacag	caggagtgggt	22320
atccaaatcc	atatcgtgcc	tcactttttg	aggagtagca	tggtgcttgt	tgtgcatgga	22380
gttccacata	tctccagatc	cagccaatcc	gaatccagca	gtgaaagctt	ggattctctt	22440
atcccaccag	atgtttccgg	tcaaagaaga	atgtcctccc	tcattgttga	cccatccaca	22500
tctagctccg	aagaagcaag	cgtaaaccac	cacagaggac	acaacgtatc	tagcgtacat	22560
caagtagggt	cccaaagcgt	acatagcagc	caactcagcg	aatctgtaag	caacatgagc	22620
aggagaaggc	ttgaagaatc	cgtccctctc	caactccttt	ctccacttag	cgaatcctg	22680
gagcatctca	gcatcatcca	ctttagcggg	cttagcaggt	ctagaaggca	aagcagccaa	22740
agccttccta	gcctttctag	atctgtggtg	gaactccttg	aaagcctcag	tagcatcagc	22800
tccagtgtta	gagagagcgt	agaaaatcac	ggttcctcca	ggatgtttga	aatcggtcac	22860
atcgtactca	actccctcga	taaccacgta	tcttctagcg	aaggtcttag	ccaaagcagc	22920
aggttccatc	ttctcagcag	acaacttcac	gttagcctca	gctctttctc	tctctccatc	22980
gaaagcgatc	tccacagtag	ggattccatc	gttggttctcg	gtctcaacac	acatggtggc	23040
gcggttcagc	ttgatcgctc	tattaattag	ttcattgttt	tatacgtgaa	gaaaaagaaa	23100
gagacggaat	atatggcaaa	aaacatgcaa	ggggacgtgt	gttaacatac	gtgtcttatg	23160
actaattatt	cgtagtggca	gtttctacca	tctggaaatg	gaattgatat	acacaggcca	23220
gcaagacact	ctagcttacc	atagagcatt	ttcatgcaca	cttttttaaa	agacaaagga	23280
agtatattaa	tagatgggtc	taattctgaa	tgttttatta	cctttaacat	tccaacaagg	23340
ttaaaaccaa	tgtttcaaga	tgtcaatgtg	tccttcacaa	actcatatat	tgaattacta	23400
gtttgaccaa	gatataaggg	ttaactctaa	aacataagaa	aatatgacac	aatataaaaa	23460

taaatatcag	atatattgag	agatctcaaa	attattaaga	ataaaatadc	taagtattaa	23520
tattgttggt	ggtattctaa	aggtgacagg	tgataaatta	tattattgta	aaatttaaaa	23580
taagagaata	tttttatatt	gttgtaaaat	ttaaaataag	agaatatttt	tgagttacgt	23640
tttgactaa	atttctattg	atggattttg	gactttgaaa	taccataatt	tctattcaat	23700
tcattacaca	tttttttcca	gcatacaatt	tagcattaca	aagtttttat	ataggcttga	23760
agaaaagtaa	catagaaaac	aataattcaa	aaatcaagac	gaggactatt	tggttttctc	23820
aatcttaatg	atacaacttt	atcataattt	taaataagga	caataattat	aatgtgatga	23880
ttacaatttt	cttataatac	ttactaaagg	tagtggtggt	tacaacacat	taattttaac	23940
actccccctt	aatgtgttgc	tctttaactc	ccattacttc	tctaagttgt	taaaatcttc	24000
ctctttgtag	tatttttagta	aaagtgtctg	taagttgctc	ttatgaactg	cagaaaggta	24060
actgcacatt	tccttcttca	atcactcttc	gaatgaagtg	gtgttttatg	ttaatgtgtc	24120
tagtccgact	atgaaaaaca	ggattctttg	tggtgtacta	caaaattttt	cctctcagtc	24180
ttcaagaatt	ttctcataag	atcttccatg	acatcaagtt	tgagcactg	atacatcaat	24240
ttaggtttgg	aattggcaca	agagcaaaat	ggtcaattgc	acactgaaaa	gtcaaacttt	24300
gacttttgca	tcaacatcaa	atttcaagaa	tcacatttca	tcaagacatg	ttagaatatg	24360
aagtttggtt	tattaagaaa	gtcaaaagtc	aagtttgctt	tggaaaagtc	aaaattctaa	24420
acacttagaa	atttttctaa	ctgttaagaa	atatgacaag	ttcagaactt	ctggccagat	24480
tttcaccatg	atgcaagttg	attctggaag	aacttctgac	acaagagttg	tagatttcaa	24540
tgagatctaa	gacattgcgg	aacagaactt	ctcttaaaaa	tgatgggatt	tcaagttata	24600
aatctttgaa	gacacgtcca	tgaaactgaa	gtactcaata	aattttgggc	cttccaaga	24660
cgggaatttg	ttagaacttc	tggagcagtt	ttcacgtagg	ttcaatcaga	gtttgcaaga	24720
gtaattcaaa	gaaagtctac	aaagcatggt	acaagctttc	tgaaaagtct	tagaactcct	24780
tcagaacatg	ttggaacaga	gagattcaaa	gatcagaagt	tggatacagt	ccgggccgct	24840
gatggccggc	ctaacctgca	ggatacaagt	gcgcacagac	tagcggccgc	taatcccggg	24900
aattaccggt	agtaggcgcc	ctgaattaac	gccgaattaa	ttcgggggat	ctggatttta	24960
gtactggatt	ttggtttttag	gaattagaaa	ttttattgat	agaagtattt	tacaaataca	25020
aatacatact	aagggtttct	tatatgctca	acacatgagc	gaaaccctat	aggaacccta	25080
attccccttat	ctgggaacta	ctcacacatt	attatggaga	aactcgagct	tgtcgagata	25140
tcgggctaga	gcgccaccgc	ggtggagatc	tgcggcctta	attaatcaag	cggacttctt	25200
cttctttgga	gccatgtagg	attgcacgaa	gaactgagcg	aagaggaaga	aaagggagag	25260
aatgtacacg	aagtacacga	tgggtgattct	gagggaaacc	ttatcgcatc	cgtggaaaac	25320
caagtaggta	gcttgggaca	tcattgatgt	gaattgcaag	agttggaaag	cgggtcaaaga	25380
tgacttccac	cagattggca	aagactttcc	ggtcttagaa	tccttggtgt	gcatgcagat	25440
gaagtagtag	gtgtacatca	cgggtgtgaat	gaatccgttg	aggaggatgg	tcaagaagat	25500

atctccatcg	tagagcacgt	tagcgttcaa	ccagtagaag	aggaagatgg	tggtatgatg	25560
gtacacgtgc	aagaaagaga	gttgtctcca	cttctttccg	agcacaatga	agatgggtatc	25620
ccagaaatcc	cacactttgg	agatgtagaa	gagccagagc	aagttagcaa	ctgggtggatc	25680
gttcacgttg	aagtgggtgc	atggcataac	gggtgatccg	ttcctataag	cgaggaatcc	25740
agcctcaaca	gtcatgtaag	cgcagaggaa	gatttgagac	acgttgtaga	ggaacttgat	25800
aggggtatggg	tccatagctg	ggagagattg	catcacagca	gatcccaaga	tcacgaaagc	25860
gatgtagatg	agagcaatgg	tgatagcggg	tctgaaatcg	cacaaccacc	aatcctccct	25920
atcagctctg	aactttccat	ctggatcact	ccaatcgatg	atagcagctc	caatcttattc	25980
catagcagcg	ttataagcat	ccatgggtact	ggctatgaag	aaattataat	cgtgtaaaac	26040
ttagtgaagt	tgtatgaatg	aaagtattgc	aaaatcctca	ttatatagac	tacatgcata	26100
actagttgca	tgtaaatttg	tagttttctt	cattattgca	tcctccaagt	ggatgtcatg	26160
gttttacaca	tggtttccat	gcaaatacatt	tccaaaatat	ttttaaactt	tccacagggc	26220
atccatgcat	gcacctcaaa	acttggtgtg	ggtaacattg	ttgtcttgaa	aaattactaa	26280
accttttgtc	cacgtgacgt	tcatgcacct	caaatcttgt	gtgggtaccat	tattatcctc	26340
aagaattatt	gaatgtttgg	tgtatatgcc	atccatgcag	cattgcaaca	attaaatctc	26400
caaaccttgt	ggtaccatat	tcactcactt	taattctcct	atagtagaaa	tattagcaaa	26460
tatttacatt	tccagttgat	tagtatatgt	atttagaaga	caaaaataat	ttagaatcaa	26520
ttaatcaact	tgcaaattgc	taagtgttgg	caaacgttag	cataaaaggt	gttataaatt	26580
tagtaccaaa	tataaaaatt	tatcgcaaat	caaatacata	acacacatag	taaaacaaaa	26640
acaaattaca	agggttttaga	cgttttagtgg	caatgtgtaa	atttgctgca	gtggccggcc	26700
tagtagattt	aaattggcct	tagtggccaa	gcttggcgta	atcatggcaa	ctttt	26755

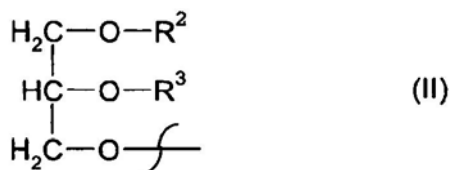
REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo que consiste de:
 - (a) una secuencia de ácidos nucleicos tal como se muestra en SEC ID n° 1,
 - (b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID n° 2,
 - (c) secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida con un ácido nucleico de (a) o (b) bajo condiciones de hibridación restrictivas, en la que las condiciones de hibridación restrictivas son hibridaciones en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de una o más etapas de lavado en 0,2 x SSC, SDS al 0,1% a una temperatura de entre 50°C y 65°C y en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica para un polipéptido con actividad de $\Delta 5$ desaturasa y especificidad de acil-CoA.
2. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido consiste de ARN o ADN.
3. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1 o 2.
4. Vector según la reivindicación 3, en el que el vector es un vector de expresión.
5. Vector según la reivindicación 3 o 4, en el que el vector comprende por lo menos un polinucleótido adicional que codifica para un enzima adicional que participa en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos.
6. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1 o 2 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Célula huésped según la reivindicación 6, en la que la célula huésped comprende además por lo menos un enzima adicional que participa en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos.
8. Vector según la reivindicación 5 o la célula huésped según la reivindicación 7, en el que el enzima se selecciona de entre el grupo que consiste de: acil-CoA deshidrogenasa(s), acil-ACP [=proteína portadora de acilo] desaturasa(s), acil-ACP tioesterasa(s), ácido graso aciltransferasa(s), acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasa(s), ácido graso sintasa(s), ácido graso hidroxilasa(s), acetil-coenzima A carboxilasa(s), acil-coenzima A oxidasa(s), ácido graso desaturasa(s), ácido graso acetilasa(s), lipoxigenasa(s), triacilglicerol lipasa(s), aleno óxido sintasa(s), hidroperóxido liasa(s), ácido graso elongasa(s), $\Delta 4$ -desaturasa(s), $\Delta 5$ -desaturasa(s), $\Delta 6$ -desaturasa(s), $\Delta 8$ -desaturasa(s), $\Delta 9$ -desaturasa(s), $\Delta 12$ -desaturasa(s), $\Delta 5$ -elongasa(s), $\Delta 6$ -elongasa(s) y $\Delta 9$ -elongasa(s).
9. Método para generar un polipéptido con actividad de desaturasa, que comprende las etapas:
 - (a) expresar un polinucleótido según la reivindicación 1 o 2 en una célula huésped, y
 - (b) obtener, de la célula huésped, el polipéptido que está codificado por el polinucleótido según (a).
10. Polipéptido que está codificado por el polinucleótido según la reivindicación 1 o 2.
11. Anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID n° 2.
12. Organismo no humano transgénico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1 o 2, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o la célula huésped según la reivindicación 8.
13. Organismo no humano transgénico según la reivindicación 12, en el que el organismo es un animal, una planta o un microorganismo multicelular.
14. Método para la producción de una sustancia que presenta la estructura mostrada en la fórmula general I a continuación:

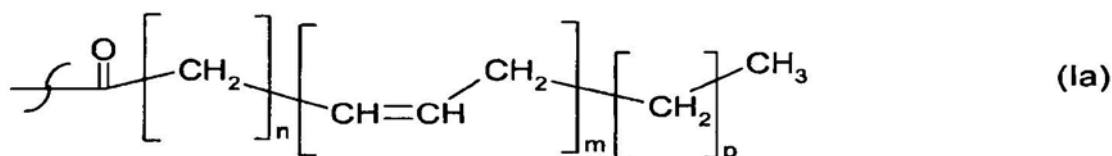


en la que las variables y sustituyentes son los siguientes:

R¹=hidroxilo, coenzima A (tioéster), lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, base esfingo o un radical de fórmula II:



R²=hidrógeno, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol o alquil C₂-C₂₄-carbonilo saturado o insaturado, R³=hidrógeno, alquil C₂-C₂₄-carbonilo saturado o insaturado, o R² y R³ independientemente uno de otro son un radical de fórmula Ia:



n = 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 9, m = 2, 3, 4, 5 o 6 y p = 0 o 3,

y en el que el método comprende el cultivo de: (i) una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o (ii) de un organismo no humano transgénico según la reivindicación 12 o 13 bajo condiciones que permiten la biosíntesis de la sustancia.

15. Método para la producción de una composición de aceites, lípidos o ácidos grasos, que comprende las etapas del método según la reivindicación 14 y la etapa adicional de formular la sustancia como composición de aceites, lípidos o ácidos grasos.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la composición de aceites, lípidos o ácidos grasos se formula adicionalmente para proporcionar un fármaco, un producto cosmético, un alimento, un pienso, preferentemente alimento para peces, o un complemento alimenticio.

17. Utilización del polinucleótido según la reivindicación 1 o 2, del vector según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, de la célula huésped según la reivindicación 6 o 7, del vector o la célula huésped según la reivindicación 8, del polipéptido según la reivindicación 10 o del organismo no humano transgénico según la reivindicación 12 o 13 para la producción de una composición de aceites, lípidos o ácidos grasos.

18. Utilización según la reivindicación 17, en el que la composición de aceites, lípidos o ácidos grasos está destinada al uso como fármaco, producto cosmético, alimento, pienso, preferentemente alimento para peces o complemento alimenticio.

Fig. 1

```

      *           20           *           40           *
SEC ID 1 : --MSIAAKDAASAHSSVLDPKYHCAATN--K-SRTDAAGLTWSSIDTSKEM : 45
d6-Des (Ot) : KGVETENNDDGIETVELATDGERERAGANVKSSAEKMEPAALAKTFARRYV : 50

      60           *           80           *           100
SEC ID 1 : IIRGEVYDVSDFFKHPGGSIIEKSLG---SDATBAYNNFHIRSKKAARM : 92
d6-Des (Ot) : VIEGVYDVDTDFK--HPPGTVIHYALNTTSDATBAYNNFHIRSKKARKK : 98

      *           120           *           140           *
SEC ID 1 : LRALPSRPVAGGARDALS--DPEATRAQLRSEGYPFPTNHVAYRVAEV : 141
d6-Des (Ot) : LRALPSRPAAKTAKVDAEDTQDFKWKKELEKRGEEKESPANHVAYRVAEL : 148

      160           *           180           *           200
SEC ID 1 : VAMYDAGIELLIWAGYWFHESIVAGIACG--RCGWLQHEGGHYSLTGNINID : 190
d6-Des (Ot) : VAMYLGTYLMIYARYVSSVLVYKFCRCGWLQHEGGHYSLTGNININD : 198

      *           220           *           240           *
SEC ID 1 : RRMQMILYCLGGMSCGYNRNCHNKKHATPQKLGADPDLOTFLVAHSD : 240
d6-Des (Ot) : KRICATAGGCLAGSGDNNSMHNKKHATPQKVRHDDLETTPEVAFENT : 248

      260           *           280           *           300
SEC ID 1 : ICAKGR--EICKSNLAWOAPFFREVENTILVSEGWCEVQHPERALRVENQ : 288
d6-Des (Ot) : AVEENRERGGFSKYNLRLOAWTEIP-VTSGLVLEWTFSLHPSKALRGQY : 297

      *           320           *           340           *
SEC ID 1 : IELEYMALRYALWYFAFGHLGLGFAIRLAEYVA---VSGTYIFTNEFVS : 335
d6-Des (Ot) : EELVNNLAEVIRIWTIKQVTGTAMQSHGLELAESVSGCYLFAEFESIS : 347

      360           *           380           *           400
SEC ID 1 : HTHLDVVPCHKHISNTEYSANHTNQSS-NTPLVNNWMAAYLNFQIEHHLPF : 384
d6-Des (Ot) : HTHLDVVPDEHLKVRVAVDHTSDDEDSGQWVNNMAGYLNQVVIHLPF : 397

      *           420           *           440           *
SEC ID 1 : SMPQYCHPKTCGPVQQLPDKHAEYEVRTYAKSNRDTYVNNLLAVGVASHH : 434
d6-Des (Ot) : SMPQFRQPEVSRREVAEKKNWNLNKKVITYAFAWKATPCNLDNVG-KHY : 446

      460           *
SEC ID 1 : LHMORNEGLTTRESAAVRVTGN : 455
d6-Des (Ot) : VHGCHSEGLT----- : 456

```

Fig 2.

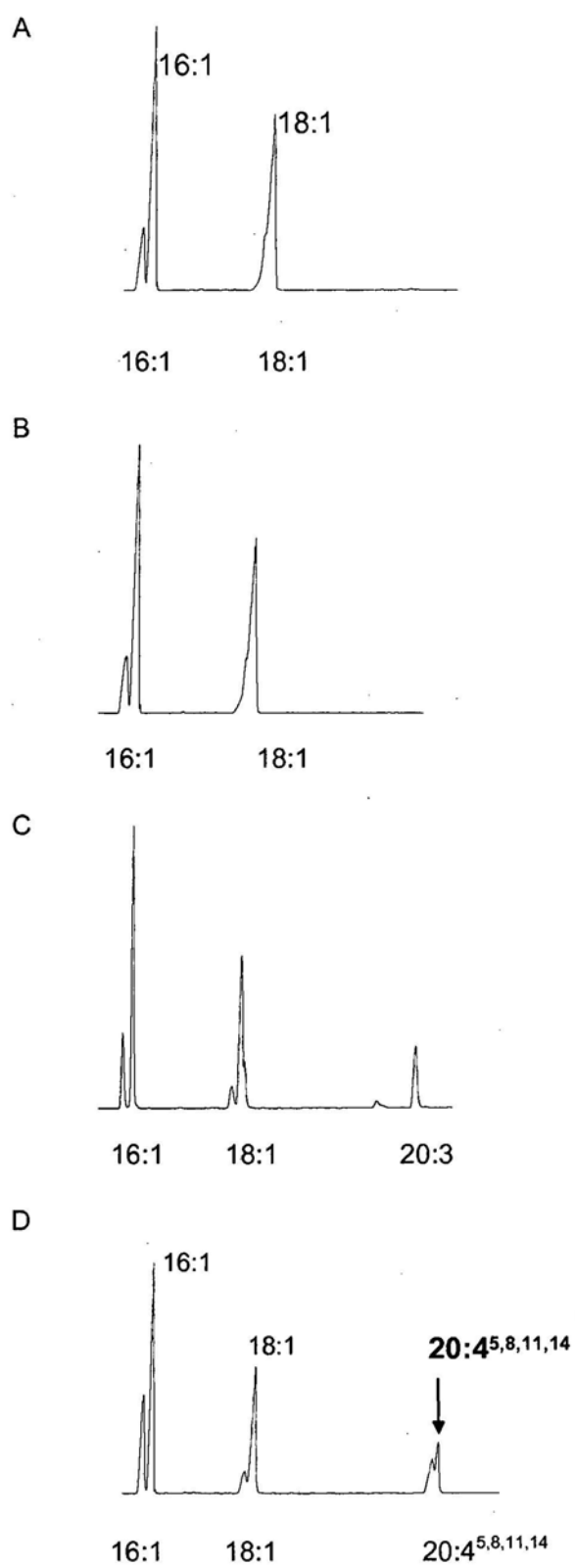


Fig. 3

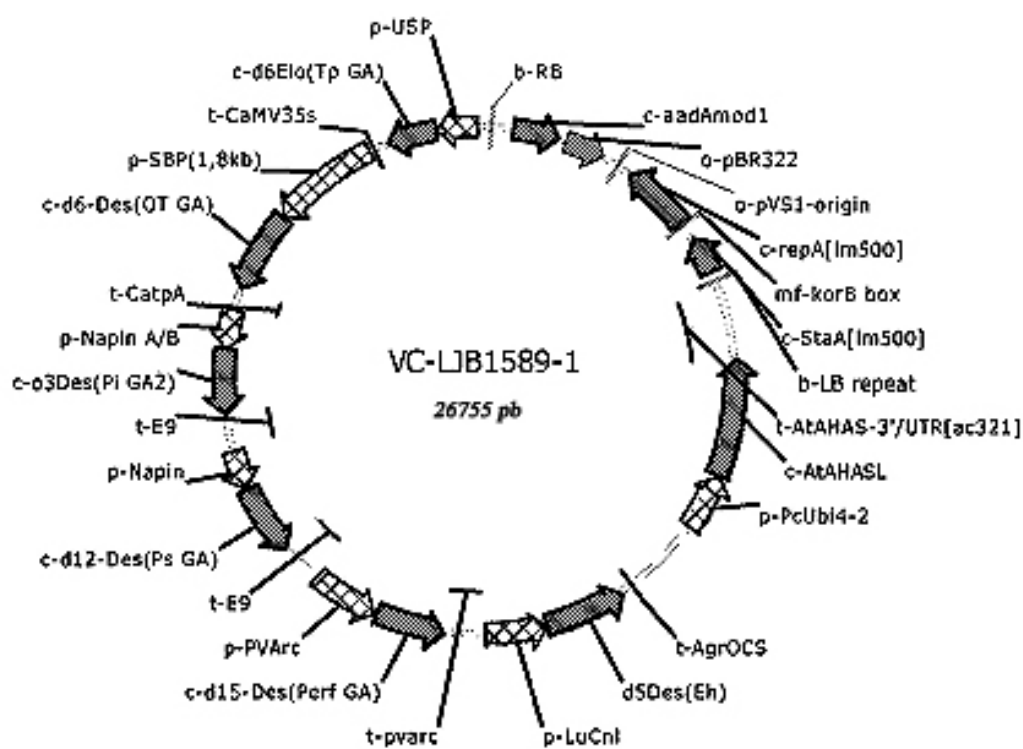


Fig. 4

