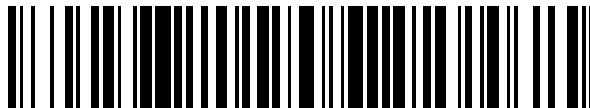


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 875**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2007 E 07758640 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2001277**

54 Título: **Producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos heterólogos usando sistemas de policétido sintasa de AGPI**

30 Prioridad:

15.03.2006 US 783205 P
21.03.2006 US 784616 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2015

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

METZ, JAMES G.;
KUNER, JERRY M. y
LIPPMEIER, JAMES CASEY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 527 875 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

Producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos heterólogos usando sistemas de policétido sintasa de AGPI

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al uso de proteínas auxiliares y dianas para mejorar la producción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y particularmente, AGPI de cadena larga (AGPICL), en un organismo huésped que se ha modificado genéticamente con un sistema de tipo PKS para producir tales AGPI (es decir, un sistema de PKS de AGPI o una AGPI sintasa). La presente invención también se refiere a los organismos que se han modificado genéticamente para expresar tales proteínas auxiliares o modificado con respecto a tales dianas, y a métodos de preparación y uso de tales organismos.

10

15 **Antecedentes de la invención**

Se considera que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son útiles para aplicaciones nutricionales, aplicaciones farmacéuticas, aplicaciones industriales y otros fines. Sin embargo, el suministro actual de AGPI a partir de fuentes naturales y a partir de síntesis química no es suficiente para las necesidades comerciales. Los aceites vegetales derivados de cosechas de semillas oleaginosas son relativamente baratos y no tienen los problemas de contaminación asociados con los aceites de pescado. Sin embargo, los AGPI encontrados en aceites vegetales desarrollados comercialmente se limitan normalmente a ácido linoleico (dieciocho carbonos con 2 dobles enlaces, en las posiciones delta 9 y 12 - 18:2 delta 9,12) y ácido linolénico (18:3 delta 9,12,15). Se requieren varias enzimas desaturasa y elongasa separadas para la síntesis de ácidos grasos a partir de ácidos linoleico y linolénico para producir los AGPI más saturados y de cadena más larga. Por tanto, la modificación por ingeniería genética de células huésped vegetales para la expresión de AGPI tales como EPA y ácido docosahexaenoico (DHA) puede requerir la expresión de varias enzimas separadas para lograr la síntesis. Adicionalmente, para la producción de cantidades utilizables de tales AGPI, pueden requerirse esfuerzos de modificación por ingeniería genética adicionales. Por tanto, el descubrimiento de un sistema alternativo para la producción de AGPI, que es un sistema de tipo policétido sintasa, ha proporcionado una alternativa significativa a la modificación por ingeniería genética de plantas u otros organismos (por ejemplo, microorganismos) usando las desaturasas y elongasas de la ruta de síntesis de ácidos grasos "clásica" o "habitual".

20

25

30

35

40

Ha habido muchos esfuerzos para producir AGPI en plantas de cosecha de semillas oleaginosas mediante la modificación de los ácidos grasos producidos de manera endógena. La modificación genética de estas plantas con diversos genes individuales para ácido graso elongasas y desaturasas ha producido hojas o semillas que contienen niveles significativos de AGPI tales como EPA, pero que también contienen niveles significativos de AGPI menos insaturados y de cadena más corta (Qi *et al.*, Nature Biotech. 22:739 (2004); publicación PCT n.º WO 04/071467; Abbadí *et al.*, Plant Cell 16:1 (2004)); Napier y Sayanova, Proceedings of the Nutrition Society (2005), 64:387-393; Robert *et al.*, Functional Plant Biology (2005) 32:473-479; o la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0172682.

45

Por tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica para un método para producir eficaz y eficientemente cantidades de lípidos (por ejemplo, triacilglicerol (TAG) y fosfolípido (PL)) enriquecidos en AGPI deseados en plantas de semillas oleaginosas.

50

Los sistemas de policétido sintasa (PKS) se conocen generalmente en la técnica como complejos enzimáticos relacionados con sistemas de ácido graso sintasa (FAS), pero que a menudo están altamente modificados para producir productos especializados que normalmente muestran poca semejanza con ácidos grasos. Sin embargo, se ha mostrado que existen sistemas de policétido sintasa en bacterias marinas y determinadas microalgas que pueden sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA. Estos sistemas se denominan en el presente documento sistemas de PKS de AGPI, sistemas de tipo PKS para la producción de AGPI o sistemas de AGPI sintasa, todos los cuales se usan de manera intercambiable en el presente documento.

55

60

65

Las rutas de PKS de AGPI para la síntesis de AGPI en *Shewanella* y otras bacterias marinas, *Vibrio marinus*, se describen en detalle en la patente estadounidense n.º 6.140.486. Las rutas de PKS de AGPI para la síntesis de AGPI en el traustocitridio eucariota, *Schizochytrium*, se describe en detalle en la patente estadounidense n.º 6.566.583. Las rutas de PKS de AGPI para la síntesis de AGPI en eucariotas tales como miembros de Thraustochytriales, incluyendo la descripción adicional de un sistema de PKS de AGPI en *Schizochytrium* y la identificación de un sistema de PKS de AGPI en *Thraustochytrium*, incluyendo detalles referentes a usos de estos sistemas, se describen en detalle en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641, publicada el 19 de diciembre de 2002, y en la publicación PCT n.º WO 2006/135866, publicada el 21 de diciembre de 2006. La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127, publicada el 25 de noviembre de 2004, da a conocer la descripción estructural detallada de un sistema de PKS de AGPI en *Thraustochytrium*, y detalle adicional referente a la producción de ácido eicosapentaenoico (C20:5, ω-3) (EPA) y otros AGPI usando tales sistemas. La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995, publicada el 12 de mayo de 2005,

da a conocer la descripción estructural y funcional de sistemas de PKS de AGPI en *Shewanella olleyana* y *Shewanella japonica*, y usos de tales sistemas. Estas solicitudes también dan a conocer la modificación genética de organismos, incluyendo microorganismos y plantas, con los genes que comprenden la ruta de PKS de AGPI y la producción de AGPI por tales organismos. Además, la publicación de patente PCT n.º WO 05/097982 describe un sistema de PKS de AGPI en *Ulkenia*, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050014231 describe genes y proteínas PKS de AGPI de *Thraustochytrium aureum*.

Por consiguiente, se han descrito las estructuras de dominios básicas y las características de secuencia de la familia de enzimas AGPI sintasa, y se ha demostrado que las enzimas AGPI sintasa pueden realizar la síntesis *de novo* de diversos AGPI (por ejemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n-3), ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) y ácido docosapentaenoico (DPAn-6; C22:5n-6). Se ha demostrado que los productos de AGPI pueden acumularse en fosfolípidos (PL) del organismo huésped y, en algunos casos, en los lípidos neutros (por ejemplo, triacilgliceroles (TAG)). Sin embargo, por lo que conocen los presentes inventores, el mecanismo preciso para la transferencia del AGPI de la enzima a esas dianas no se ha definido anteriormente a la presente invención.

Puesto que el mecanismo de transferencia de AGPI a destinos diana en un organismo puede tener implicaciones para aumentar la eficacia de y/o mejorar la producción de AGPI en un organismo que se ha modificado genéticamente para producir tales AGPI, hay una necesidad en la técnica de información referente a este mecanismo. Por consiguiente, también hay una necesidad en la técnica de métodos de producción de AGPI mejorados, incluyendo en plantas y microorganismos que se han modificado genéticamente para producir tales AGPI, que se aprovechen del conocimiento de tal mecanismo.

Sumario de la invención

Una realización de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que es idéntica en al menos el 75% a una ACoAS que tiene una secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 83.

Otra realización de la invención se refiere a una proteína aislada codificada por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente.

Otra realización de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, operativamente unida a una secuencia de control de la expresión.

Aún otra realización de la invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico recombinante descritas anteriormente. En un aspecto, la célula huésped es un microorganismo. En otro aspecto, la célula huésped es una célula vegetal.

Otra realización de la invención se refiere a un organismo modificado genéticamente, que es un microorganismo o una planta en el que el organismo se ha modificado genéticamente para expresar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente o cualquier combinación de las mismas. En un aspecto, el organismo expresa una AGPI sintasa y una fosfopanteteinilo transferasa (PPTasa). En un aspecto, el organismo se ha modificado genéticamente para expresar la sintasa y la PPTasa. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.

Otra realización se refiere a un organismo modificado genéticamente, en la que el organismo expresa una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para expresar una o más acil-CoA sintetetas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma a partir de un organismo que expresa de manera endógena una AGPI sintasa. En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de *Cryptocodinium cohnii*, en el que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de un microorganismo de Thraustochytriales, en el que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de *Schizochytrium*, en el que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de

- ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI, en el que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).
- Otra realización se refiere a un organismo modificado genéticamente, en la que el organismo expresa una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.
- Otra realización se refiere a un organismo modificado genéticamente, en la que el organismo expresa una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo.
- Aún otra realización se refiere a un organismo modificado genéticamente, en la que el organismo expresa una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), en la que el organismo contiene una modificación genética para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI, en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG). En un aspecto, la proteína es una DAGAT o una LPAAT. En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de un traustoqueitridio o un laberintúlido que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG). En un aspecto, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de *Schizochytrium* que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG). En un aspecto, el organismo comprende una modificación adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.
- En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII.
- En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido representada por SEQ ID NO: 81.
- En una realización adicional, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.
- En aún una realización adicional, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; o en la que el

organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

5 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

15 En aún otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

25 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI, en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

35 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI, en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

50 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

55 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG). En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la re presentada por SEQ ID NO: 81; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81; en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a

partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

5 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.

15 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

25 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

35 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

45 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG). En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

- 5 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.
- 10
- 15 En una realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.
- 20
- 25
- 30 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.
- 35
- 40 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; y en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.
- 45
- 50 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).
- 55
- 60
- 65 En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una

secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido, incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo.

En otra realización, la invención proporciona un organismo modificado genéticamente, incluyendo un microorganismo, una planta, una parte de la planta o una célula vegetal, en la que el organismo se ha modificado genéticamente con una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), y en la que al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para la AGPI sintasa o la PPTasa está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de direccionamiento a plástido incluyendo, pero sin limitarse a la representada por SEQ ID NO: 81, en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA; en la que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en la que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG); y en la que el organismo comprende una modificación genética adicional para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) endógena o una proteína asociada con una FAS expresada por el organismo. En algunas realizaciones, el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una de las proteínas KASII o KASIII.

En otras realizaciones, el organismo produce un nivel aumentado de dicho al menos un AGPI en comparación con la ausencia de dicha inhibición de KASII o KASIII.

La modificación genética puede comprender la transformación del organismo con un constructo de iARN que inhibe la expresión o actividad de KASII, o un constructo de iARN que inhibe la expresión o actividad de KASIII. El constructo de iARN puede comprender una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento por SEQ ID NO: 122 o por SEQ ID NO: 124.

En otras realizaciones, la modificación genética comprende la transformación del organismo con una molécula de ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión o actividad de KASII, o una molécula de ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión o actividad de KASIII. La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento por SEQ ID NO: 123 o por SEQ ID NO: 125.

En realizaciones en las que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más acil-CoA sintetasas (ACoAS) heterólogas o un homólogo de la misma que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA, el organismo puede transformarse con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de *Cryptothecodinium cohnii*, en la que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) de *Schizochytrium* o un homólogo que es idéntica en al menos el 60% a la secuencia de aminoácidos que codifica para la ACoAS de *Schizochytrium*, en la que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En todavía otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que es idéntica en al menos el 60% a una ACoAS que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 99. En todavía otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 97. En aún realizaciones adicionales, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 85, y con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En todavía realizaciones adicionales, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 98.

En algunas realizaciones en las que el organismo contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI; y en las que la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilglicerol (TAG), el organismo expresa de manera endógena una AGPI sintetasa. En otras realizaciones, la proteína es una DAGAT o una LPAAT. En otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de un traustocitridio o un laberintúlido que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilglicerol (TAG). En todavía otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de *Schizochytrium* que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilglicerol (TAG). En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 60% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 113. En otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 113; y más preferiblemente una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 104. En todavía otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En otras realizaciones, el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 112. En las que el organismo se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de *Cryptothecodinium cohnii* que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilglicerol (TAG). En determinadas realizaciones, el organismo se transforma con una

molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 90% a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 121.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un traustokitridio o un laberintúlido. En algunas realizaciones, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un microorganismo de Thraustochytriales. En otras realizaciones, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un organismo seleccionado del grupo que consiste en: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia* y
 10 *Labyrinthula*. En todavía otras realizaciones, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Schizochytrium sp.*, n.º de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) 20888, *Thraustochytrium* 23B, n.º de la ATCC 20892 y un mutante de cualquiera de estos microorganismos. En algunas realizaciones, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de una bacteria marina. En otras realizaciones, la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Shewanella*, *Moritella* y
 15 *Photobacterium*. En todavía otras realizaciones, la AGPI sintasa consiste en una o más proteínas que comprenden:

al menos un dominio de enoil-ACP reductasa (ER);

20 al menos cuatro dominios de proteína transportadora de acilo (ACP);

al menos dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS);

al menos un dominio de aciltransferasa (AT);

25

al menos un dominio de β -cetoacil-ACP reductasa (KR);

al menos dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA; y

30 al menos un dominio de factor de longitud de cadena (CLF);

al menos un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT).

En realizaciones adicionales, la AGPI sintasa consiste en una o más proteínas que comprenden:

35

dos dominios de enoil ACP-reductasa (ER);

ocho o nueve dominios de proteína transportadora de acilo (ACP);

40 dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS);

un dominio de aciltransferasa (AT);

un dominio de cetorreductasa (KR);

45

dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA;

un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); y

50 un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT).

En todavía realizaciones adicionales, la AGPI sintasa es una AGPI sintasa bacteriana que produce AGPI a temperaturas de al menos aproximadamente 25°C, y en la que la AGPI sintasa consiste en una o más proteínas que comprenden:

55

al menos un dominio de enoil ACP-reductasa (ER);

al menos seis dominios de proteína transportadora de acilo (ACP);

60 al menos dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS);

al menos un dominio de aciltransferasa (AT);

al menos un dominio de cetorreductasa (KR);

65

al menos dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA;

al menos un dominio de factor de longitud de cadena (CLF);

5 al menos un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT); y

al menos un dominio de 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa).

10 En algunas realizaciones, la AGPI sintasa comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: una cualquiera de SEQ ID NO: 1-32 y una cualquiera de SEQ ID NO: 35-80.

15 En algunas realizaciones, una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para la AGPI sintasa se han optimizado para la mejorar la expresión de la AGPI sintasa en la planta o célula vegetal. En otras realizaciones, la expresión de la AGPI sintasa y la PPTasa se dirige al plástido de la planta o célula vegetal.

20 En algunas realizaciones, el organismo modificado genéticamente es una planta y la planta es una planta de semillas oleaginosas. En otras realizaciones, la planta es una planta dicotiledónea. En todavía otras realizaciones, la planta se selecciona de, pero no se limita a, el grupo que consiste en: canola, soja, colza, linaza, maíz, cártamo, girasol y tabaco.

25 En todavía otras realizaciones, el organismo modificado genéticamente produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) seleccionado del grupo que consiste en: EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6) y/o SDA (C18:4, n-3)), y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el organismo modificado genéticamente produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) seleccionado del grupo que consiste en: DHA, EPA y DPAn-6. En otras realizaciones, el organismo modificado genéticamente produce DHA y DPAn-6. En todavía otras realizaciones, el organismo modificado genéticamente produce ARA.

30 En algunas realizaciones, el organismo modificado genéticamente comprende al menos el 0,5% en peso de dicho al menos un AGPI. En otras realizaciones, los ácidos grasos totales producidos por dicha AGPI sintasa, distintos de dicho al menos un AGPI, comprenden menos de aproximadamente el 10% en peso de los ácidos grasos totales producidos por dicho organismo. En todavía otras realizaciones, los ácidos grasos totales producidos por dicha AGPI sintasa, distintos de dicho al menos un AGPI, comprenden menos de aproximadamente el 5% en peso de los ácidos grasos totales producidos por dicho organismo.

35 En todavía realizaciones adicionales, el perfil de ácidos grasos totales en la planta, parte de la planta o célula vegetal comprende al menos aproximadamente el 0,5% en peso de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) que tiene al menos veinte carbonos y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono, y en las que el perfil de ácidos grasos totales en la planta o parte de la planta contiene menos del 5% en total de todos de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono.

45 En todavía realizaciones adicionales, el perfil de ácidos grasos totales en la planta, parte de la planta o la célula vegetal comprende al menos aproximadamente el 0,5% en peso de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) que tiene al menos veinte carbonos y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono, y en las que el perfil de ácidos grasos totales en la planta o parte de la planta contiene menos del 1% de cada uno de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono.

50 En aún realizaciones adicionales, el perfil de ácidos grasos totales en la planta, parte de la planta o célula vegetal comprende al menos aproximadamente el 0,5% en peso de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) que tiene al menos veinte carbonos y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono, y en las que el perfil de ácidos grasos totales en la planta o parte de la planta contiene menos del 2% de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6) y ácido dihomo-gamma-linolénico ácido (DGLA o HGLA; 20:3, n-6).

55 En otras realizaciones, el perfil de ácidos grasos totales en el organismo modificado genéticamente contiene menos del 1% en peso de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6) y ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA o HGLA; 20:3, n-6).

60 En otras realizaciones, el perfil de ácidos grasos totales en el organismo modificado genéticamente comprende al menos aproximadamente el 0,5% en peso de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) que tiene al menos veinte carbonos y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono, y en las que el perfil de ácidos grasos totales en la planta o parte de la planta contiene menos del 1% de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6).

65

En otras realizaciones, el perfil de ácidos grasos totales en el organismo modificado genéticamente contiene menos del 0,5% en peso de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6).

5 También se describe en el presente documento un aceite obtenido a partir de cualquiera de los organismos modificados genéticamente de la invención. Se proporciona un aceite que comprende cantidades detectables de DHA (ácido docosahexaenoico (C22:6, n-3)) y DPA (ácido docosapentaenoico (C22:5, n-6), en el que la razón de DPAn-6 con respecto a DHA es 1:1 o mayor de 1:1, en el que el aceite vegetal se obtiene a partir de cualquiera de los organismos modificados genéticamente de la invención.

10 Cuando el organismo modificado genéticamente es una planta, la invención proporciona semillas obtenidas a partir de la planta.

La invención también proporciona un producto alimenticio que comprende cualquier semilla de la presente invención.

15 La presente divulgación también proporciona un método para producir un aceite que comprende al menos un AGPI, que comprende recuperar un aceite de una semilla de la presente invención.

La presente invención proporciona un método para producir un aceite que comprende al menos un AGPI, que comprende recuperar un aceite de un organismo modificado genéticamente para expresar una molécula de ácido nucleico que codifica para una AGPI sintasa, una molécula de ácido nucleico que codifica para una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y al menos una molécula de ácido nucleico de la invención.

20

La presente divulgación también proporciona un método para producir al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI), que comprende hacer crecer cualquier microorganismo o planta modificado genéticamente de la presente invención.

25

La presente divulgación proporciona además un método para proporcionar un suplemento o producto terapéutico que contienen al menos un AGPI a un individuo, que comprende proporcionar al individuo un organismo modificado genéticamente de la presente invención, semillas de la presente invención o un producto alimenticio de la presente invención.

30

La presente divulgación también proporciona un método para producir los organismos modificados genéticamente anteriores, que comprende transformar un organismo con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican para la AGPI sintasa y la PPTasa, en la que el organismo contiene una modificación genética para inhibir la expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII.

35

La presente divulgación también proporciona un método para producir los organismos modificados genéticamente anteriores, que comprende transformar un organismo con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican para la AGPI sintasa y la PPTasa, y además modificar genéticamente el organismo para inhibir la expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en KASII y KASIII.

40

La invención también proporciona un procedimiento para transformar un organismo para expresar AGPI, que comprende transformar un organismo con moléculas de ácido nucleico que codifican para una AGPI sintasa, con una molécula de ácido nucleico que codifica para una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y con cualquiera de la acil-CoA sintetasa o aciltransferasa descrita en el presente documento. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética para deleccionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo. En un aspecto, el organismo contiene una modificación genética para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo. El organismo puede incluir una planta o un microorganismo, por ejemplo.

45

50 **Breve descripción de los dibujos de la invención**

La figura 1 es una imagen digitalizada que muestra un análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de ensayos de actividad *in vitro* de homogeneizados libres de células de la cepa de *Schizochytrium* Ac66 y mutantes deficientes en AGPI-S y deficientes en FAS derivados de esa cepa.

55

La figura 2 es una imagen digitalizada que muestra el análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* en la cepa deficiente en FAS de *Schizochytrium*. Se ejecutaron las reacciones durante los tiempos indicados.

60

La figura 3 es una imagen digitalizada que muestra el análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS de *Schizochytrium*. Se usaron componentes de ensayo convencionales pero se variaron los componentes de NADH, NADPH y acetil-CoA (carril 1 - NADH/NADPH/acetil-CoA, carril 2 - NADPH/acetil-CoA, carril 3 - NADH/acetil-CoA, carril 4 - NADH/NADPH, carril 5 - nada).

65

La figura 4 es una imagen digitalizada que muestra el análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS de *Schizochytrium*. Se ejecutaron las reacciones durante 10 minutos, luego se añadieron ATP y Mg+2. Se detuvieron las reacciones a los tiempos indicados en la parte inferior (^{''}= s, [']= min).

5 La figura 5 es una imagen digitalizada que muestra el análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS de *Schizochytrium*. Se ejecutaron las reacciones durante 10 minutos, se añadieron ATP y Mg+2 (excepto en la muestra 1) y las incubaciones continuaron durante 20 min adicionales (carril 3 - 2 ul de DMSO, carril 4 - 4 ul de DMSO, carril 5 - 25 uM de Triascin C, carril 6 - 100 uM de Triascin C, carril 7 - 200 uM de Triascin C).

15 La figura 6A es una imagen digital que muestra el análisis de EMAG de *E. coli* que expresa OrfA, OrfB*, OrfC y Het I de *Schizochytrium*. Se muestran AGPI objetivo en el homogeneizado, la fracción de sedimento de alta velocidad (P2), la fracción de sobrenadante (S1) y la fracción de sobrenadante de alta velocidad (S2).

La figura 6B es una imagen digital que muestra los resultados de ensayos de muestras de la misma cepa de *E. coli* usada para la figura 6A, excepto porque los productos lipídicos se extrajeron simplemente con HIP (en vez de convertirse en EMAG) antes de la separación mediante CCF.

20 La figura 7 es un perfil de EMAG de levadura control y levadura que expresa OrfsA, OrfsB, OrfC y Het I de *Schizochytrium*.

La figura 8 es el perfil de EMAG para la levadura de la figura 1, expandido para ilustrar la producción de AGPI objetivo.

25 La figura 9 es un gráfico que muestra los efectos de la inhibición de la actividad FAS sobre los perfiles de DHA (como porcentaje de EMAG total) de levadura que expresa AGPI sintasa de *Schizochytrium* (sOrfA, sOrfB, OrfC) y Het I, sola o en combinación con la expresión de una acil CoA sintetasa.

30 La figura 10 es un gráfico que muestra los efectos de la inhibición de la actividad FAS sobre los perfiles de DHA y DPAn6 (como porcentaje de EMAG total) de levadura que expresa AGPI sintasa de *Schizochytrium* (sOrfA, sOrfB, OrfC) y Het I, sola o en combinación con la expresión de una acil CoA sintetasa.

35 La figura 11 es un perfil de EMAG que muestra los efectos combinados de la inhibición de la actividad FAS (mediante cerulenina), la expresión de AGPI sintasa de *Schizochytrium* (sOrfA, sOrfB, OrfC) y Het I, y la expresión de una acil CoA sintetasa, sobre la producción de DHA y DPAn6 en levadura.

La figura 12 muestra el perfil de lípidos de un *Schizochytrium* en el que se ha desactivado un gen de DAGAT.

40 La figura 13 es un perfil de EMAG de *Arabidopsis* de tipo natural y la línea de *Arabidopsis* 263 (con direccionamiento a plástido), que expresan los Orf A, B*, C y Het I de *Schizochytrium* durante el desarrollo de semillas.

45 La figura 14 es un perfil de EMAG de una semilla de *Arabidopsis* de la línea 1087-7 (con direccionamiento a plástido), que expresa los Orf A, B*, C y HetI de *Schizochytrium* dirigidos al plástido combinado con la inhibición de FAS (KAS III antisentido) durante el desarrollo de semillas.

50 La figura 15 es un perfil de EMAG de semillas de *Arabidopsis* reunidas de la línea 1366 que expresan los Orf A, B*, C y HetI de *Schizochytrium* dirigidos al plástido combinado con la inhibición de FAS (iARN de KAS II) y ACS-1 durante el desarrollo de semillas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a la provisión de proteínas o dianas (generalmente denominadas en el presente documento "proteínas auxiliares" o "dianas auxiliares"), y a moléculas de ácido nucleico que codifican para tales proteínas, para la mejora de la producción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y particularmente, AGPI de cadena larga (AGPICL), en un organismo huésped que se ha modificado genéticamente para producir tales AGPI. La presente invención también se refiere a los organismos que se han modificado genéticamente para expresar determinadas de tales proteínas, y a métodos de preparación y uso de tales proteínas y organismos. La presente invención también se refiere a modificaciones genéticas adicionales en organismos que producen AGPI (incluyendo mediante modificación genética para producir AGPI), que pueden incluir delecciones o inactivaciones de genes o dianas particulares en el organismo. En particular, la presente invención se refiere a la modificación genética de organismos que expresan un sistema de PKS de AGPI (o bien de manera endógena o bien mediante manipulación genética), para mejorar o potenciar la producción y/o acumulación de AGPI por el organismo. Por ejemplo, la presente invención también se refiere a la modificación por ingeniería genética de la regulación por disminución de enzimas que compiten por el sustrato y a la modificación por ingeniería genética de actividades enzimáticas superiores tal como mediante mutagénesis, o al direccionamiento de enzimas a orgánulos de plástidos, así como el

citosol.

Según la presente invención, un organismo que se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI (también conocido como un sistema de AGPI sintasa, que se usa de manera intercambiable con sistema de PKS de AGPI o sistema de tipo PKS para la producción de AGPI), en el que el organismo no expresa de manera natural (de manera endógena, sin modificación genética) un sistema de este tipo, o al menos ese sistema de PKS de AGPI particular o parte del mismo con el que el organismo está modificándose genéticamente, puede denominarse en el presente documento organismo huésped "heterólogo" con respecto a la modificación del organismo con el sistema de PKS de AGPI o con otra proteína que no se expresa de manera endógena por el organismo. Las modificaciones genéticas de la presente invención también pueden usarse para mejorar la producción de AGPI en un organismo huésped que expresa de manera endógena un sistema de PKS de AGPI, en el que el organismo no se modifica adicionalmente con un sistema de PKS de AGPI diferente o una parte del mismo.

Más particularmente, los presentes inventores han descubierto y dado a conocer por primera vez en el presente documento que los productos de ácidos grasos de la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (principalmente DHA y DPA-6) se liberan de esa enzima como ácidos grasos libres (AGL), y que el mecanismo de liberación es integral para la enzima. Este mecanismo de liberación de productos se cree que es una característica de todos los sistemas enzimáticos de PKS de AGPI (AGPI sintasa) de traustozoa, y puede ser una característica de todos los sistemas de PKS de AGPI eucariotas, incluyendo sistemas de laberintúlidos. Además, los presentes inventores muestran, usando *Schizochytrium* como modelo, que los AGL de DHA y DPA se esterifican posteriormente con coenzima A (CoA) mediante la acción de una acil-CoA sintetasa (ACoAS o ACS) o sintetasa endógena. Estas formas activadas de ácidos grasos (acil-CoA) pueden servir entonces como sustratos para enzimas que forman PL y TAG.

Las enzimas endógenas de *Schizochytrium* son muy eficaces en la conversión de los productos de AGL de su AGPI sintasa en acil-CoA y luego el uso de los mismos en la síntesis de PL y TAG. Esto se evidencia por el alto nivel de acumulación de DHA y DPA en fracciones de PL y aceite de *Schizochytrium*. Sin embargo, sin querer restringirse a la teoría, los presentes inventores creen que las enzimas ACoAS presentes en huéspedes heterólogos en los que los sistemas de AGPI sintasa pueden transformarse pueden no llevar a cabo esas reacciones tan eficazmente como lo hacen las ACoAS del organismo donador de AGPI sintasa. Adicionalmente, las enzimas aciltransferasa endógenas que forman PL y TAG en esos nuevos organismos huésped pueden no utilizar eficazmente AGPI-CoA como sustratos, particularmente en comparación con el organismo del que se derivó la AGPI sintasa. Los inventores también proponen que aciltransferasas de determinados organismos puede ser generalmente mejores enzimas para la acumulación de AGPI en el aceite y las fracciones de aceite de organismos huésped, especialmente determinados AGPI, que enzimas similares de otros organismos (por ejemplo, una aciltransferasa de un organismo puede transferir más unidades de DHA-CoA a un TAG que una aciltransferasa de un organismo diferente). Por tanto, los presentes inventores dan a conocer en el presente documento que un organismo como *Schizochytrium*, pero no limitado a *Schizochytrium*, (por ejemplo, un traustozoa y otro organismo, y particularmente otro organismo eucariota), que produce sus AGPI por medio de un enzima AGPI sintasa (sistema de PKS de AGPI) o a través de otro sistema de biosíntesis de cadenas de acilo, y que acumula altos niveles de AGPI en sus PL y TAG, servirán como una buena fuente de genes que codifican para esas enzimas.

El descubrimiento por los presentes inventores de la liberación del producto de AGPI de la AGPI sintasa como un AGL representa tanto desafíos como oportunidades en cuanto a transferir el sistema a huéspedes heterólogos, y proporciona una oportunidad sustancial para controlar y mejorar la eficacia de la producción de AGPI en un organismo huésped heterólogo.

A modo de explicación, los AGPI de cadena larga (AGPICL) no se producen como AGL como parte de la ruta de biosíntesis de AGPI "habitual" o "clásica" (definida a continuación). De hecho, los organismos habitualmente sólo se encontrarán con un AGPI como AGL cuando se proporciona de manera exógena. Por ejemplo, *E. coli*, como la mayoría de las bacterias, no sintetiza AGPI. Los ácidos grasos saturados o monoinsaturados de 16 y 18 carbonos producidos por estos organismos se sintetizan sobre proteínas transportadoras de acilo (ACP) por medio de un sistema de FAS de tipo II. Las acil-ACP sirven como sustratos para las enzimas que forman PL. *E. coli* puede utilizar una variedad de AGL como fuentes de carbono exógenas. Esos AGL se convierten en acil-CoA antes de su entrada en PL o en un ciclo de degradación. El gen de FadD codifica para la única enzima ACoAS conocida en *E. coli*, y mutaciones en ese gen dan como resultado la incapacidad para crecer en AGL como la única fuente de carbono.

Los organismos eucariotas producen normalmente ácidos grasos saturados (de 16 y 18 carbonos) usando una ácido graso sintasa (FAS) de tipo I (o una FAS de tipo II en el caso de plantas superiores). Los productos del sistema de FAS pueden liberarse como AGL (por ejemplo FAS animal) o como acil-CoA (por ejemplo FAS fúngica). En el caso de plantas, la FAS de tipo II se localiza en plástidos. En este caso, se producen ácidos grasos de 16 ó 18 carbonos por medio de la FAS de tipo II y, a menudo, se forma un único doble enlace mientras que el ácido graso está unido a ACP. Los acil-ACP pueden servir como sustratos para la formación de PL de plástidos. Para los ácidos grasos destinados a la exportación del plástido (para su uso en PL citoplasmáticos o para la síntesis de TAG), una acil-ACP tioéstera hidroliza el enlace tioéster para liberar un AGL. El AGL se exporta entonces del plástido y se convierte en una acil-CoA mediante una ACoAS citoplasmática. Estas acil-CoA sirven como sustratos para enzimas de síntesis

de PL y TAG.

La ruta "habitual" o "clásica" para la síntesis de AGPI de cadena larga (AGPICL) en organismos eucariotas implica la modificación de ácidos grasos monoinsaturados o saturados de longitud de cadena media (por ejemplo, los productos de los sistemas de FAS descritos anteriormente). Estas modificaciones consisten en etapas de elongación y etapas de desaturación. Los sustratos para la reacción de elongación son acil-CoA graso (la cadena de ácido graso que va a elongarse) y malonil-CoA (la fuente de los dos carbonos añadidos durante cada reacción de elongación). El producto de la reacción con elongasa es un acil-CoA graso que tiene dos carbonos adicionales en la cadena lineal. Normalmente no se producen ácidos grasos libres (AGL) en este ciclo de reacción. Las desaturasas crean dobles enlaces cis en la cadena de ácido graso preexistente mediante la extracción de dos hidrógenos en una reacción dependiente de oxígeno. Los sustratos para las desaturasas son o bien acil-CoA (en algunos animales) o bien ácidos grasos que se esterifican en la cadena principal de glicerol de un PL (por ejemplo, fosfatidilcolina). De nuevo, no se producen AGL en este mecanismo de reacción. Por tanto, la única vez que se producen AGL en rutas de síntesis de AGPICL "habituales" o "clásicas" es durante la liberación de los ácidos grasos de algunos sistemas de FAS. Tal como se comentó anteriormente, éstos son normalmente ácidos grasos de 16 ó 18 carbonos y habitualmente son ácidos grasos o bien saturados o bien monoinsaturados, no AGPI de cadena más larga tales como EPA o DHA. Una consecuencia de este esquema para la producción de AGPI de cadena larga es que a menudo se acumulan productos intermedios en la ruta, que representan a menudo la mayoría de los ácidos grasos novedosos producidos por el sistema.

Por tanto, según la presente invención, la referencia a una ruta "habitual" o "clásica" para la producción de AGPI se refiere a la ruta de síntesis de ácidos grasos en la que ácidos grasos saturados de longitud de cadena media (por ejemplo, productos de un sistema de ácido graso sintasa (FAS)) se modifican mediante una serie de reacciones de elongación y desaturación. Los sustratos para la reacción de elongación son acil-CoA graso (la cadena de ácido graso que va a elongarse) y malonil-CoA (la fuente de los 2 carbonos añadidos durante cada reacción de elongación). El producto de la reacción con elongasa es un acil-CoA graso que tiene dos carbonos adicionales en la cadena lineal. Las desaturasas crean dobles enlaces cis en la cadena de ácido graso preexistente mediante la extracción de 2 hidrógenos en una reacción dependiente de oxígeno. Tales rutas y los genes implicados en tales rutas se conocen bien en la bibliografía (por ejemplo, véanse los antecedentes).

La ruta para la síntesis de AGPI de cadena larga por medio de las enzimas PKS de AGPI (AGPI sintasa) (descrita en detalle a continuación) es muy diferente de la ruta "habitual" descrita anteriormente. Las AGPI sintasas utilizan malonil-CoA como fuente de carbono y producen el AGPI final sin liberar productos intermedios en cualquier cantidad significativa. Los dobles enlaces cis apropiados se añaden durante la síntesis usando un mecanismo que no requiere oxígeno. Se usa NADPH como reductor durante los ciclos de síntesis. En al menos sistemas de PKS de AGPI de traustocitridio, las enzimas liberan el producto de AGPI como un AGL, tal como se ha dado a conocer por primera vez por los presentes inventores en el presente documento. Este mecanismo de liberación es parte de la propia enzima. Por tanto, la liberación de AGPICL como AGL a partir del sistema enzimático de AGPI es una característica única del sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* y probablemente es una característica de todos los sistemas de AGPI sintasa eucariotas tales como aquéllos en traustocitridios.

Por consiguiente, los presentes inventores proponen que, cuando se expresa un sistema de PKS de AGPI (sistema de AGPI sintasa) en un huésped heterólogo (por ejemplo, un organismo huésped que no expresa de manera endógena ese sistema de PKS de AGPI particular), un factor a considerar con respecto a la optimización de la producción y acumulación de AGPI en los compartimentos o fracciones lipídicas deseados es la capacidad de la(s) enzima(s) acil-CoA sintetasa (ACoAS) endógena(s) de ese huésped para reconocer el producto de AGL del sistema introducido como sustrato para la conversión en la acil-CoA correspondiente. Puesto que, tal como se comentó anteriormente, la mayoría de los organismos huésped heterólogos en los que puede introducirse un sistema de PKS de AGPI habitualmente sólo se encuentran con un AGPI como un AGL cuando se proporciona de manera exógena, el organismo huésped puede no tener proteínas auxiliares óptimas en el sitio para manipular los AGL, lo que puede representar un factor inhibitorio en la producción y acumulación óptimas de AGPI en un compartimento o fracción lipídica deseado por un organismo huésped. Por ejemplo, se sabe bien que hay varias familias de proteínas que tienen actividad ACoAS, y que las preferencias de sustrato de AGL de estas enzimas pueden ser bastante específicas. Por tanto, las ACoAS presentes en algunos posibles huéspedes pueden no convertir eficazmente AGL de AGPI de cadena larga en acil-CoA, particularmente si esos huéspedes no se encuentran normalmente con las formas de AGL de esos AGPI. Además, un organismo huésped puede no tener aciltransferasas óptimas que formen PL y TAG y puedan utilizar el AGPI-CoA como sustratos. Finalmente, incluso en organismos huésped que expresan de manera endógena un sistema de PKS de AGPI, los presentes inventores creen que es posible modificar genéticamente el organismo usando las modificaciones comentadas en el presente documento para mejorar la acumulación de AGPI en los aceites y fracciones de aceite en el organismo.

La ruta y los descubrimientos por los presentes inventores descritos anteriormente proporcionan varias directrices o estrategias para la producción de AGPI en huéspedes heterólogos (o nativos) mediante expresión de una AGPI sintasa:

1. Optimización génica Puede ser necesaria la optimización de las secuencias génicas para que coincidan con las

del huésped heterólogo para obtener la expresión de las proteínas. Esto se ilustra en los ejemplos descritos más adelante, en los que se optimizan genes que codifican para proteínas de un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* para el uso de codones en un huésped bacteriano así como levaduras. También se encontró que un gen optimizado para su uso en bacterias también es útil para la expresión de la PKS de AGPI de *Schizochytrium* en plantas. Se describen a continuación detalles referentes a estos genes optimizados.

2. Expresión de PPTasa Los presentes inventores han determinado que PPTasas endógenas presentes en *E. coli*, levaduras y plantas no pueden activar los dominios ACP de AGPI sintasa. Los presentes inventores han identificado anteriormente una PPTasa alternativa adecuada, Het I de *Nostoc* (descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641), que puede usarse en huéspedes cuyas PPTasas endógenas no activan los dominios ACP de AGPI sintasa. También se describen otras PPTasas adecuadas y pueden obtenerse fácilmente. El uso de PPTasas en una variedad de células huésped heterólogas se describe y se muestra a modo de ejemplo a continuación.

3. Modificación del flujo de sustrato/inhibición de FAS Las AGPI sintasas utilizan malonil-CoA como fuente de carbono para las reacciones de elongación. El malonil-CoA también se usa por FAS, reacciones de elongación de ácidos grasos citoplasmáticas y otras enzimas (por ejemplo, chalcona sintasa). La AGPI sintasa compite con estos otros sistemas enzimáticos por el malonil-CoA. Esto indica que un modo para aumentar el flujo a través de la ruta de AGPI sintasa sería potenciar su capacidad para competir por la(s) reserva(s) de malonil-CoA. Hay muchos modos posibles para lograr una capacidad potenciada para competir por este sustrato. Estos incluyen, pero no se limitan a, 1) inhibición de rutas competidoras, incluyendo la inhibición de cualquier elemento en la ruta de FAS, por ejemplo, reduciendo los niveles de expresión de enzimas o subunidades implicadas en esas rutas (por ejemplo, mediante el uso de ARN antisentido, iARN, cosupresión o mutaciones), 2) expresión de la AGPI sintasa en huéspedes heterólogos en los que se han reducido o bloqueado rutas competidoras (por ejemplo, en canola en la que la capacidad para elongar ácidos grasos en el citoplasma se ha bloqueado) y/o 3) aumentando la reserva de malonil-CoA (por ejemplo, mediante expresión de acetil-CoA carboxilasa). Se describen ejemplos de esta estrategia en más detalle a continuación y se ilustran en los ejemplos.

4. Expresión de Acil-CoA sintetasas Las enzimas presentes en *Schizochytrium* convierten eficazmente los productos de ácido graso libre de la AGPI sintasa en acil-CoA. Las enzimas presentes en huéspedes heterólogos pueden no llevar a cabo estas reacciones con eficacia similar puesto que esos ácidos grasos libres pueden no encontrarse normalmente en esos organismos. Por ejemplo, la expresión de enzimas acil-CoA sintetasa que convierten eficazmente los productos de ácido graso libre de las diversas AGPI sintasas (por ejemplo, DHA, DPA n-6, EPA u otros productos) en acil-CoA en esos huéspedes heterólogos puede dar como resultado un aumento de la capacidad para acumular esos productos. En este sentido, *Schizochytrium*, u otros organismos que producen AGPI por medio de la ruta de AGPI sintasa, servirán como una buena fuente de genes que codifican para esas enzimas (véase la descripción y los ejemplos más adelante).

5. Expresión de aciltransferasas y enzimas relacionadas Las enzimas presentes en *Schizochytrium* utilizan eficazmente las formas de acil-CoA de los productos de la AGPI sintasa para sintetizar moléculas de PL y TAG. Las enzimas presentes en huéspedes heterólogos pueden no llevar a cabo estas reacciones con eficacia similar puesto que esos AGPI-CoA pueden no encontrarse normalmente en esos organismos. Por ejemplo, la expresión de enzimas de síntesis de PL o TAG que integran eficazmente los productos de acil-CoA de las diversas AGPI sintasas (por ejemplo, DHA-CoA, DPA n-6-CoA, EPA-CoA u otras) en moléculas de PL o TAG en esos huéspedes heterólogos puede dar como resultado el aumento de la capacidad para acumular esos productos. En este sentido, *Schizochytrium*, u otros organismos que producen AGPI por medio de la ruta de AGPI sintasa, servirán como una buena fuente de genes que codifican para esas enzimas (véase la descripción y los ejemplos a continuación).

6. Expresión específica de orgánulos Se prevén otros métodos en el presente documento que pueden utilizarse para aumentar la cantidad, o alterar el perfil, de AGPI que se acumulan en huéspedes heterólogos. Como un ejemplo, puede expresarse el sistema de AGPI sintasa en compartimentos separados en el huésped, accediendo de ese modo a reservas de malonil-CoA separadas, lo que puede dar como resultado un aumento de la acumulación (por ejemplo, en el plástido y el citoplasma de células vegetales). Esta estrategia también se muestra a modo de ejemplo en los ejemplos más adelante.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una solución a la posible inhibición de la producción y/o acumulación de AGPI en organismos huésped heterólogos y también proporciona una oportunidad única para controlar y potenciar la producción de AGPI en cualquier organismo que produce AGPI usando un sistema de PKS de AGPI (o bien mediante modificación genética o bien de manera endógena). Específicamente, la presente invención proporciona diversas dianas en forma de proteínas y moléculas de ácido nucleico que codifican para tales proteínas que pueden expresarse en organismos que se han modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI, así como otras modificaciones genéticas y estrategias descritas en el presente documento, con el fin de potenciar o aumentar la producción y/o acumulación de AGPI por el organismo, particularmente en fracciones lipídicas o compartimentos deseados en el organismo. Tales dianas pueden denominarse generalmente en el presente documento dianas "auxiliares" para un sistema de PKS de AGPI. Tal como se usa en el presente documento, una diana puede representar una molécula de ácido nucleico y/o su proteína codificada para la que se

desea expresión o sobreexpresión en un organismo huésped tal como se describe en el presente documento, así como una diana para delección o inactivación, o incluso un orgánulo diana (por ejemplo, direccionamiento al plástido de una planta). En otras palabras, una diana puede ser un elemento añadido a, o cualquier modificación de un sistema enzimático para la producción de AGPI, y particularmente un sistema de PKS de AGPI, en el que la diana se identifica como útil con respecto al aumento o la mejora de la producción y/o acumulación de ácidos grasos en un organismo huésped.

Sistemas de PKS de AGPI (AGPI sintasas)

Por consiguiente, la presente invención se refiere a la provisión de proteínas auxiliares y otras dianas para su uso en relación con un sistema de PKS de AGPI. Tal como se usa en el presente documento, un sistema de PKS de AGPI (que también puede denominarse un sistema de AGPI sintasa o AGPI sintasa) generalmente tiene las siguientes características identificativas: (1) produce AGPI, y particularmente, AGPI de cadena larga, como producto natural del sistema; y (2) comprende varias proteínas multifuncionales ensambladas en un complejo que realiza tanto el procesamiento iterativo de la cadena de ácido graso así como el procesamiento no iterativo, incluyendo isomerización trans-cis y reacciones de reducción de enoílo en ciclos seleccionados. Además, los dominios ACP presentes en las enzimas AGPI sintasa requieren activación mediante la unión de un cofactor (4-fosfopanteteína). La unión de este cofactor se lleva a cabo mediante fosfopanteteinil transferasas (PPTasa). Si las PPTasas endógenas del organismo huésped no pueden activar los dominios ACP de AGPI sintasa, entonces es necesario proporcionar una PPTasa que pueda llevar a cabo esa función. Los inventores han identificado la enzima Het I de *Nostoc* sp. como una PPTasa adecuada y a modo de ejemplo para activar dominios ACP de AGPI sintasa. La referencia a un sistema de PKS de AGPI o una AGPI sintasa se refiere colectivamente a todos los genes y sus productos codificados que funcionan en un complejo para producir AGPI en un organismo. Por tanto, el sistema de PKS de AGPI se refiere específicamente a un sistema de PKS para el que los productos naturales son AGPI.

Más específicamente, un sistema de PKS de AGPI tal como se le hace referencia en el presente documento produce ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y particularmente, AGPI de cadena larga (AGPICL), como productos. Por ejemplo, un organismo que contiene de manera endógena (de manera natural) un sistema de PKS de AGPI produce AGPI usando este sistema. Según la presente invención, los AGPI son ácidos grasos con una longitud de cadena de carbono de al menos 16 carbonos, y más preferiblemente al menos 18 carbonos, y más preferiblemente al menos 20 carbonos, y más preferiblemente 22 o más carbonos, con al menos 3 o más dobles enlaces, y preferiblemente 4 o más, y más preferiblemente 5 o más, e incluso más preferiblemente 6 o más dobles enlaces, en los que todos los dobles enlaces están en la configuración cis. La referencia a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) en el presente documento se refiere más particularmente a ácidos grasos de una longitud de cadena de carbono de 18 y más, y preferiblemente una longitud de cadena de carbono de 20 y más, que contienen 3 o más dobles enlaces. Los AGPICL de la serie omega-6 incluyen: ácido gamma-linolénico (C18:3), ácido di-homo-gamma-linolénico (C20:3n-6), ácido araquidónico (C20:4n-6), ácido adrenico (también denominado ácido docosatetraenoico o DTA) (C22:4n-6) y ácido docosapentaenoico (C22:5n-6). Los AGPICL de la serie omega-3 incluyen: ácido alfa-linolénico (C18:3), ácido eicosatrienoico (C20:3n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3), ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3), ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Los AGPICL también incluyen ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más dobles enlaces incluyendo pero sin limitarse a C28:8(n-3).

Un sistema de PKS de AGPI según la presente invención también comprende varias proteínas multifuncionales (y puede incluir proteínas de un única función, particularmente para sistemas de PKS de AGPI de bacterias marinas) que se ensamblan en un complejo que realiza tanto el procesamiento iterativo de la cadena de ácido graso así como el procesamiento no iterativo, incluyendo la isomerización trans-cis y reacciones de reducción de enoílo en ciclos seleccionados. Estas proteínas también pueden denominarse en el presente documento como complejo enzimático de PKS de AGPI central o sistema de PKS de AGPI central. Las funciones generales de los dominios y motivos contenidos dentro de estas proteínas se conocen individualmente en la técnica y se han descrito en detalle con respecto a diversos sistemas de PKS de AGPI de bacterias marinas y organismos eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.140.486; la patente estadounidense n.º 6.566.583; Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001); la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995 y la publicación PCT n.º WO 2006/135866). Los dominios pueden encontrarse como una única proteína (es decir, el dominio y la proteína son sinónimos) o como uno de dos o más (múltiples) dominios en una única proteína, tal como se mencionó anteriormente.

La arquitectura de dominios de diversos sistemas de PKS de AGPI de bacterias marinas y miembros de *Thraustochytrium*, y las características estructurales y funcionales de genes y proteínas que comprenden tales sistemas de PKS de AGPI, se han descrito en detalle (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.140.486; la patente estadounidense 6.566.583; Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001); la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995 y la publicación PCT n.º WO 2006/135866).

Los sistemas de PKS de AGPI y proteínas o dominios de los mismos que son útiles en la presente invención incluyen sistemas de PKS de AGPI tanto bacterianos como no bacterianos. Un sistema de PKS de AGPI no bacteriano es un sistema de PKS de AGPI que es de o se deriva de un organismo que no es una bacteria, tal como un eucariota o una arqueobacteria. Los eucariotas se separan de los procariotas basándose en el grado de diferenciación de las células, estando los eucariotas más diferenciados que los procariotas. En general, los procariotas no presentan una membrana nuclear, no muestran mitosis durante la división celular, sólo tienen un cromosoma, contienen ribosomas 70S en su citoplasma, no presentan mitocondrias, retículo endoplasmático, cloroplastos, lisosomas ni aparato de Golgi, y pueden tener flagelos, que si están presentes, contienen una única fibrilla. En cambio, los eucariotas tienen una membrana nuclear, presentan mitosis durante la división celular, tienen muchos cromosomas, contienen ribosomas 80S en su citoplasma, presentan mitocondrias, retículo endoplasmático, cloroplastos (en algas), lisosomas y aparato de Golgi, y pueden tener flagelos, que si están presentes, contienen muchas fibrillas. En general, las bacterias son los procariotas, mientras que las algas, hongos, protistas, protozoos y plantas superiores son eucariotas. Según la presente invención, pueden producirse plantas modificadas genéticamente que incorporan dominios funcionales PKS de AGPI no bacterianos con dominios funcionales PKS de AGPI bacterianos, así como proteínas o dominios funcionales PKS de otros sistemas de PKS (de tipo I iterativo o modular, de tipo II o de tipo III) o sistemas de FAS.

Preferiblemente, un sistema de PKS de AGPI de la presente invención comprende al menos los siguientes dominios biológicamente activos que normalmente están contenidos en tres o más proteínas: (a) al menos un dominio de enoil-ACP reductasa (ER); (b) múltiples dominios de proteína transportadora de acilo (ACP) (por ejemplo, al menos de desde uno hasta cuatro, y preferiblemente al menos cinco dominios ACP, y en algunas realizaciones hasta seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez dominios ACP); (c) al menos dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (d) al menos un dominio de aciltransferasa (AT); (e) al menos un dominio de β -cetoacil-ACP reductasa (KR); (f) al menos dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA; (g) al menos un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); (h) al menos un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT). En una realización, un sistema de PKS de AGPI según la presente invención también comprende al menos una región que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH).

En una realización preferida, un sistema de PKS de AGPI comprende al menos los siguientes dominios biológicamente activos: (a) al menos un dominio de enoil-ACP reductasa (ER); (b) al menos cinco dominios de proteína transportadora de acilo (ACP); (c) al menos dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (d) al menos un dominio de aciltransferasa (AT); (e) al menos un dominio de β -cetoacil-ACP reductasa (KR); (f) al menos dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA; (g) al menos un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); y (h) al menos un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT). En una realización, un sistema de PKS de AGPI según la presente invención también comprende al menos una región o un dominio que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) que no es parte de un dominio DH similar a FabA. Las características estructurales y funcionales de cada uno de estos dominios se describen en detalle en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995; y la publicación PCT n.º WO 2006/135866.

Según la presente invención, un dominio o una proteína que tiene actividad biológica (función) 3-cetoacil-ACP sintasa (KS) se caracteriza como la enzima que lleva a cabo la etapa inicial del ciclo de reacción de elongación de FAS (y PKS). El término " β -cetoacil-ACP sintasa" puede usarse de manera intercambiable con los términos "3-ceto acil-ACP sintasa", " β -ceto acil-ACP sintasa" y "ceto-acil ACP sintasa", y derivados similares. El grupo acilo destinado para la elongación se une a un residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima mediante un enlace tioéster. En la reacción de múltiples etapas, la acil-enzima experimenta condensación con malonil-ACP para formar -cetoacil-ACP, CO₂ y enzima libre. La KS desempeña un papel clave en el ciclo de elongación y en muchos sistemas se ha mostrado que presenta mayor especificidad de sustrato que otras enzimas del ciclo de reacción. Por ejemplo, *E. coli* tiene tres enzimas KS distintas, cada una con su propio papel particular en la fisiología del organismo (Magnuson *et al.*, Microbiol. Rev. 57, 522 (1993)). Los dos dominios KS de los sistemas de PKS de AGPI descritos en bacterias marinas y los traustocitridios descritos en el presente documento pueden tener distintos papeles en la secuencia de reacción biosintética de AGPI. Como una clase de enzimas, las KS se han caracterizado bien. Las secuencias de muchos genes de KS verificados se conocen, se han identificado los motivos de sitios activos y se han determinado las estructuras cristalinas de varias. Pueden identificarse fácilmente proteínas (o dominios de proteínas) como pertenecientes a la familia de enzimas de KS mediante homología con secuencias de KS conocidas.

Según la presente invención, un dominio o una proteína que tiene actividad biológica (función) malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT) se caracteriza como uno que transfiere el resto malonilo de malonil-CoA a ACP. El término "malonil-CoA:ACP aciltransferasa" puede usarse de manera intercambiable con "malonil aciltransferasa" y derivados similares. Además del motivo de sitio activo (GxSxG), estas enzimas presentan un motivo extendido de aminoácidos R y Q en posiciones clave que las identifica como enzimas MAT (por ejemplo, en contraposición a un dominio AT descrito a continuación). En algunos sistemas de PKS (pero no el dominio PKS de AGPI), los dominios MAT cargaran preferentemente metil- o etil-malonato en el grupo ACP (del éster de CoA correspondiente), introduciendo de ese modo ramificaciones en la cadena de carbono lineal. Pueden reconocerse dominios MAT por su homología

con secuencias MAT conocidas y por su estructura de motivos extendida.

Según la presente invención, un dominio o una proteína que tiene actividad biológica (función) de proteína transportadora de acilo (ACP) se caracteriza como polipéptidos pequeños (normalmente, de 80 a 100 aminoácidos de longitud), que funcionan como portadores para cadenas de acilo grasas en crecimiento por medio de una unión tioéster a un cofactor de la proteína unido covalentemente. Se producen como unidades separadas o como dominios dentro de proteínas más grandes. Las ACP se convierten de apofomas inactivas a holoformas funcionales mediante transferencia del resto fosfopanteteinilo de CoA a un residuo de serina altamente conservado de la ACP. Los grupos acilo se unen a la ACP por medio de una unión tioéster en el extremo terminal libre del resto fosfopanteteinilo. Las ACP pueden identificarse mediante marcaje con panteteína radiactiva y mediante homología de secuencia con ACP conocidas. La presencia de variaciones del motivo mencionado anteriormente (LGIDS*) es también un rasgo distintivo de una ACP.

Según la presente invención, un dominio o una proteína que tiene actividad cetorreductasa, también denominada actividad biológica (función) 3-cetoacil-ACP reductasa (KR), se caracteriza como uno que cataliza la reducción dependiente de nucleótidos de piridina de formas de 3-cetoacilo de ACP. Es la primera etapa reductora en el ciclo de elongación de la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* y una reacción realizada a menudo en biosíntesis de policétidos. El término "β-cetoacil-ACP reductasa" puede usarse de manera intercambiable con los términos "cetorreductasa", "3-cetoacil-ACP reductasa", "ceto-acil ACP reductasa" y derivados similares del término. Se observa similitud de secuencia significativa con una familia de enoil ACP reductasas (ER), la otra reductasa de FAS (pero no la familia de ER presente en los sistemas de PKS de AGPI), y la familia de alcohol deshidrogenasa de cadena corta. El análisis Pfam de la región de PKS de AGPI indicada anteriormente revela la homología con la familia de alcohol deshidrogenasa de cadena corta en la región central. El análisis Blast de la misma región revela coincidencias en el área central con enzimas KR conocidas así como una región de homología extendida con dominios de los otros sistemas caracterizados de PKS de AGPI.

Según la presente invención, un dominio o una proteína se denomina factor de longitud de cadena (CLF) basándose en las siguientes razones. El CLF se describió originalmente como característico de sistemas de PKS de tipo II (enzimas disociadas) y se planteó la hipótesis de que desempeña un papel en la determinación del número de ciclos de elongación, y por tanto la longitud de cadena, del producto final. Las secuencias de aminoácidos de CLF muestran homología con dominios KS (y se piensa que forman heterodímeros con una proteína KS), pero carecen de la cisteína del sitio activo. El papel del CLF en sistemas de PKS ha sido controvertido. Nuevas pruebas (C. Bisang *et al.*, Nature 401, 502 (1999)) sugieren un papel en el cebado (proporcionando el grupo acilo inicial que va a elongarse) de los sistemas de PKS. En este papel, se piensa que el dominio CLF descarboxila malonato (como malonil-ACP), formando así un grupo acetato que puede transferirse al sitio activo de KS. Por tanto, este acetato actúa como molécula de "cebado" que puede experimentar la reacción de elongación inicial (condensación). Se han identificado homólogos del CLF de tipo II como dominios de "carga" en algunos sistemas de PKS modulares. Se encuentra un dominio con las características de secuencia del CLF en todos los sistemas de PKS de AGPI identificados actualmente y en cada caso se encuentra como parte de una proteína de múltiples dominios.

Una "aciltransferasa" o "AT" se refiere a una clase general de enzimas que pueden llevar a cabo varias reacciones de transferencia de acilo distintas. El término "aciltransferasa" puede usarse de manera intercambiable con el término "acil transferasa". Los dominios AT identificados en los sistemas de PKS de AGPI descritos en el presente documento muestran buena homología entre sí y con dominios presentes en todos los otros sistemas de PKS de AGPI examinados actualmente y homología muy débil con algunas aciltransferasas cuyas funciones específicas se han identificado (por ejemplo con malonil-CoA:ACP aciltransferasa, MAT). A pesar de la débil homología con MAT, no se cree que este dominio AT funcione como una MAT porque no presenta una estructura de motivos extendida característica de tales enzimas (véase la descripción de dominios MAT, anteriormente). Para los fines de esta descripción, las posibles funciones del dominio AT en un sistema de PKS de AGPI incluyen, pero no se limitan a: transferencia del grupo acilo graso del/de los dominio(s) ORFA ACP a agua (es decir, una tioesterasa – liberando el grupo acilo graso como un ácido graso libre), transferencia de un grupo acilo graso a un aceptor tal como CoA, transferencia del grupo acilo entre los diversos dominios ACP o transferencia del grupo acilo graso a una molécula aceptora lipófila (por ejemplo a ácido lisofosfádico).

Según la presente invención, este dominio tiene actividad biológica enoil reductasa (ER). La enzima ER reduce el doble enlace trans (introducido por la actividad DH) en el acil-ACP graso, dando como resultado la saturación completa de esos carbonos. El dominio ER en la AGPI-PKS muestra homología con una familia recién caracterizada de enzimas ER (Heath *et al.*, Nature 406, 145 (2000)). Heath y Rock identificaron esta nueva clase de enzimas ER clonando un gen de interés de *Streptococcus pneumoniae*, purificando una proteína expresada a partir de ese gen y mostrando que tenía actividad ER en un ensayo *in vitro*. Todos los sistemas de PKS de AGPI examinados actualmente contienen al menos un dominio con homología de secuencia muy alta con el dominio ER de *Schizochytrium*, que muestra homología con la proteína ER de *S. pneumoniae*.

Según la presente invención, una proteína o dominio que tiene actividad deshidratación (DH) cataliza una reacción de deshidratación. Tal como se usa generalmente en el presente documento, la referencia a actividad DH se refiere normalmente a actividad biológica β-hidroxiacil-ACP deshidratación (DH) similar a FabA. La actividad β-

hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA elimina HOH de una β -cetoacil-ACP y produce inicialmente un doble enlace trans en la cadena de carbono. El término “ β -hidroxiacil-ACP deshidrasa similar a FabA” puede usarse de manera intercambiable con los términos “ β -hidroxil acil-ACP deshidrasa similar a FabA”, “ β -hidroxiacil-ACP deshidrasa”, “deshidrasa” y derivados similares. Los dominios DH de los sistemas de PKS de AGPI muestran

5 homología con enzimas DH bacterianas asociadas con sus sistemas de FAS (en vez de con los dominios DH de otros sistemas de PKS). Un subconjunto de DH bacterianas, las DH similares a FabA, presentan actividad isomerasa cis-trans (Heath *et al.*, J. Biol. Chem., 271, 27795 (1996)). Es la homología con las proteínas DH similares a FabA la que indica que uno o todos los dominios DH descritos en el presente documento son responsables de la inserción de los dobles enlaces cis en los productos de PKS de AGPI.

10 Una proteína PKS de AGPI útil de la invención puede tener también actividad deshidratasa que no se caracteriza como similar a FabA (por ejemplo, la actividad cis-trans descrita anteriormente está asociada con actividad similar a FabA), denominada generalmente en el presente documento actividad no similar a FabA, o actividad biológica β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) no similar a FabA. Más específicamente, se encuentra un motivo de sitio activo conservado (~13 aminoácidos de longitud: L*xxHxxxGxxxxP, por ejemplo, ilustrado por los aminoácidos 2504-2516 de SEQ ID NO: 70; *en el motivo, L también puede ser I) en dominios deshidratasa en sistemas de PKS (Donadio S, Katz L. Gene. 1 de febrero de 1992; 11 1(1):51-60). Este motivo conservado, denominado también en el presente documento motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) o motivo de DH, se encuentra en una región similar de todas las secuencias de AGPI-PKS conocidas descritas hasta la fecha y en las secuencias de PKS de

15 AGPI descritas en el presente documento, pero se cree que este motivo se ha detectado sólo recientemente. Este motivo conservado está dentro de una región no caracterizada de alta homología en la secuencia de AGPI-PKS. La biosíntesis propuesta de AGPI por medio de AGPI-PKS requiere una deshidratación no similar a FabA, y este motivo puede ser responsable de la reacción.

25 Para fines de ilustración, se describe en detalle a continuación la estructura de varios sistemas de PKS de AGPI. Sin embargo, debe entenderse que esta invención no se limita al uso de estos sistemas de PKS de AGPI.

Sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium*

30 En una realización, un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* comprende al menos los siguientes dominios biológicamente activos: (a) dos dominios de enoil-ACP reductasa (ER); (b) entre cinco y diez o más dominios de proteína transportadora de acilo (ACP), y en un aspecto, nueve dominios ACP; (c) dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (d) un dominio de aciltransferasa (AT); (e) un dominio de β -cetoacil-ACP reductasa (KR); (f) dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) similar a FabA; (g) un dominio de factor de longitud de cadena (CLF);

35 y (h) un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT). En una realización, un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* según la presente invención también comprende al menos una región o un dominio que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) que no es una parte de un dominio DH similar a FabA. Las características estructurales y funcionales de estos dominios se conocen generalmente de manera individual en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 6.566.583; Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001); la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; y la publicación PCT n.º WO 2006/135866).

Hay tres marcos de lectura abiertos que forman el sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* central descrito anteriormente. La estructura de dominios de cada marco de lectura abierto es tal como sigue.

45 Marco de lectura abierto A (OrfA) de *Schizochytrium*:

La secuencia de nucleótidos completa para OrfA se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 1. OrfA es una secuencia de 8730 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 2910 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 2. Dentro de OrfA hay doce dominios: (a)

50 un dominio de β -ceto acil-ACP sintasa (KS); (b) un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT); (c) nueve dominios de proteína transportadora de acilo (ACP); y (d) un dominio de cetorreductasa (KR). Se han aislado y secuenciado clones de ADN genómico (plásmidos) que codifican para OrfA de tanto *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 como una cepa hija de ATCC 20888, indicada como *Schizochytrium* sp., cepa N230D.

55 Un clon genómico descrito en el presente documento como JK1126, aislado de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos que abarca desde la posición 1 hasta 8730 de SEQ ID NO: 1, y codifica para la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 2. El clon genómico pJK1126 (indicado como clon genómico pJK1126 OrfA, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene el gen “OrfA” de *Schizochytrium* ATCC 20888) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006 y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7648. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK1126 OrfA, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

65 Dos clones genómicos descritos en el presente documento como clon genómico pJK306 OrfA y clon genómico pJK320 OrfA, aislados de *Schizochytrium* sp. N230D, juntos (clones solapantes) comprenden, según el mejor

entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, y codifican para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El clon genómico pJK306 (indicado como clon genómico pJK306 OrfA, en forma de un plásmido de *E. coli* que contiene la porción en 5' del gen OrfA de *Schizochytrium* sp. N230D (2,2 kB se solapan con pJK320)) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7641. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK306 OrfA, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención. El clon genómico pJK320 (indicado como clon genómico pJK320 OrfA, en forma de un plásmido de *E. coli* que contiene la porción en 3' del gen OrfA de *Schizochytrium* sp. N230D (2,2 kB se solapan con pJK306)) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7644. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK320 OrfA, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

El primer dominio en OrfA es un dominio KS, también denominado en el presente documento ORFA-KS, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFA-KS se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 7 (posiciones 1-1500 de SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFA-KS se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 8 (posiciones 1-500 de SEQ ID NO: 2). Se observa que el dominio ORFA-KS contiene un motivo de sitio activo: DXAC* (*sitio de unión a acilo C₂₁₅). Además, un motivo característico en el extremo de la región KS de *Schizochytrium*, GFGG, está presente en este dominio en SEQ ID NO: 2 y, por consiguiente, en SEQ ID NO: 8.

El segundo dominio en OrfA es un dominio MAT, también denominado en el presente documento ORFA-MAT, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFA-MAT se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 9 (posiciones 1723-3000 de SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFA-MAT se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 10 (posiciones 575-1000 de SEQ ID NO: 2). El dominio MAT comprende un aspartato en la posición 93 y una histidina en la posición 94 (correspondientes a las posiciones 667 y 668, respectivamente, de SEQ ID NO: 2). Se observa que el dominio ORFA-MAT contiene un motivo de sitio activo: GHS*XG (*sitio de unión a acilo S₇₀₆), representado en el presente documento como SEQ ID NO: 11.

Los dominios 3-11 de OrfA son nueve dominios ACP en tándem, también denominados en el presente documento ORFA-ACP (el primer dominio en la secuencia es ORFA-ACP1, el segundo dominio es ORFA-ACP2, el tercer dominio es ORFA-ACP3, etc.). El primer dominio ACP, ORFA-ACP1, está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 3343 hasta aproximadamente la posición 3600 de SEQ ID NO: 1 (OrfA). La secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFA-ACP1 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 12 (posiciones 3343-3600 de SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos que contiene el primer dominio ACP abarca de desde aproximadamente la posición 1115 hasta aproximadamente la posición 1200 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFA-ACP1 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 13 (posiciones 1115-1200 de SEQ ID NO: 2). Se observa que el dominio ORFA-ACP1 contiene un motivo de sitio activo: LGIDS* (*motivo de unión a panteteína S1157), representado en el presente documento por SEQ ID NO: 14.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los nueve dominios ACP están altamente conservadas y, por tanto, la secuencia para cada dominio no se representa en el presente documento por un identificador de secuencia individual. Sin embargo, basándose en la información dada a conocer en el presente documento, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la secuencia que contiene cada uno de los otros ocho dominios ACP. Los nueve dominios ACP juntos abarcan una región de OrfA de desde aproximadamente la posición 3283 hasta aproximadamente la posición 6288 de SEQ ID NO: 1, que corresponde a las posiciones de aminoácido de desde aproximadamente 1095 hasta aproximadamente 2096 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos para toda la región ACP que contiene los nueve dominios se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 16. La región representada por SEQ ID NO: 16 incluye los segmentos de ligador entre dominios ACP individuales. El intervalo de repetición para los nueve dominios es aproximadamente cada 330 nucleótidos de SEQ ID NO: 16 (el número real de aminoácidos medidos entre serinas de sitios activos adyacentes oscila entre 104 y 116 aminoácidos). Cada uno de los nueve dominios ACP contiene un motivo de unión a panteteína LGIDS* (representado en el presente documento por SEQ ID NO: 14), en el que S* es la serina del sitio de unión a panteteína (S). La serina del sitio de unión a panteteína (S) está ubicada cerca del centro de cada secuencia de dominio ACP. En cada extremo de la región de dominio ACP y entre cada dominio ACP está una región que está altamente enriquecida en prolina (P) y alanina (A), que se cree que es una región de ligador. Por ejemplo, entre los dominios ACP 1 y 2 está la secuencia: APAPVKAAAPVAVASAPAPA, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 15. Las ubicaciones de los residuos de serina de sitios activos (es decir, el sitio de unión a panteteína) para cada uno de los nueve dominios ACP, con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, son las siguientes: ACP1 = S₁₁₅₇; ACP2 = S₁₂₆₆; ACP3 = S₁₃₇₇; ACP4 = S₁₄₈₈; ACP5 = S₁₆₀₄; ACP6 = S₁₇₁₅; ACP7 = S₁₈₁₉; ACP8 = S₁₉₃₀; y ACP9 = S₂₀₃₄. Dado que el tamaño promedio de un dominio ACP es de aproximadamente 85 aminoácidos, excluyendo el ligador, y de aproximadamente 110 aminoácidos incluyendo el ligador, estando la serina del sitio activo aproximadamente en el centro del dominio, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las posiciones de cada uno de los nueve dominios ACP en OrfA.

El dominio 12 en OrfA es un dominio KR, también denominado en el presente documento ORFA-KR, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFA-KR se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 17 (posiciones 6598-8730 de SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFA-KR se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 18 (posiciones 2200-2910 de SEQ ID NO: 2). Dentro del dominio KR hay una región central con homología con aldehído-deshidrogenasas de cadena corta (KR es a miembro de esta familia). Esta región central abarca de desde aproximadamente la posición 7198 hasta aproximadamente la posición 7500 de SEQ ID NO: 1, que corresponde a las posiciones de aminoácido 2400-2500 de SEQ ID NO: 2.

Marco de lectura abierto B (OrfB) de *Schizochytrium*:

La secuencia de nucleótidos completa para OrfB se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 3. OrfB es una secuencia de 6177 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 2059 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 4. Dentro de OrfB hay cuatro dominios: (a) un dominio de ceto acil-ACP sintasa (KS); (b) un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); (c) un dominio de acil transferasa (AT); y (d) un dominio de enoil ACP-reductasa (ER).

Se han aislado y secuenciado clones de ADN genómico (plásmidos) que codifican para OrfB de tanto *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 como una cepa hija de ATCC 20888, indicada como *Schizochytrium* sp., cepa N230D.

Un clon genómico descrito en el presente documento como pJK1129, aislado de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. El clon genómico pJK1129 (indicado como clon genómico pJK1129 OrfB, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene el gen "OrfB" de *Schizochytrium* ATCC 20888) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7649. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK1126 OrfB, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

Un clon genómico descrito en el presente documento como clon genómico pJK324 OrfB, aislado de *Schizochytrium* sp. N230D, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. El clon genómico pJK324 (indicado como clon genómico pJK324 OrfB, en forma de un plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfB de *Schizochytrium* sp. N230D) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7643. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK324 OrfB, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

El primer dominio en OrfB es un dominio KS, también denominado en el presente documento ORFB-KS, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFB-KS se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 19 (posiciones 1-1350 de SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFB-KS se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 20 (posiciones 1-450 de SEQ ID NO: 4). Este dominio KS comprende una valina en la posición 371 de SEQ ID NO: 20 (también posición 371 de SEQ ID NO: 20). Se observa que el dominio ORFB-KS contiene un motivo de sitio activo: DXAC* (*sitio de unión a acilo C₁₉₆). Además, un motivo característico en el extremo de esta región KS, GFGG, está presente en este dominio en SEQ ID NO: 4 y por consiguiente, en SEQ ID NO: 20.

El segundo dominio en OrfB es un dominio CLF, también denominado en el presente documento ORFB-CLF, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFB-CLF se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 21 (posiciones 1378-2700 de SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFB-CLF se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 22 (posiciones 460-900 de SEQ ID NO: 4). Se observa que el dominio ORFB-CLF contiene un motivo de sitio activo de KS sin la proteína de unión a acilo.

El tercer dominio en OrfB es un dominio AT, también denominado en el presente documento ORFB-AT, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFB-AT se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 23 (posiciones 2701-4200 de SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ORFB-AT se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 24 (posiciones 901-1400 de SEQ ID NO: 4). Se observa que el dominio ORFB-AT contiene un motivo de sitio activo de GxS*xG (*sitio de unión a acilo S₁₁₄₀) que es característico de proteínas aciltransferasa (AT).

El cuarto dominio en OrfB es un dominio ER, también denominado en el presente documento ORFB-ER, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio ORFB-ER se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 25 (posiciones 4648-6177 de SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos

que contiene el dominio ORFB-ER se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 26 (posiciones 1550-2059 de SEQ ID NO: 4).

Marco de lectura abierto C (OrfC) de *Schizochytrium*:

5 La secuencia de nucleótidos completa para OrfC se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 5. OrfC es una secuencia de 4506 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 1502 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 6. Dentro de OrfC hay tres dominios: (a) dos dominios de hidroxil acil-ACP deshidrasa (DH) similares a FabA; y (b) un dominio de enoil ACP-reductasa (ER).

10 Se han aislado y secuenciado clones de ADN genómico (plásmidos) que codifican para OrfC de tanto *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 como una cepa hija de ATCC 20888, indicada como *Schizochytrium* sp., cepa N230D.

15 Un clon genómico descrito en el presente documento como pJK1131, aislado de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. El clon genómico pJK1131 (indicado como clon genómico pJK1131 OrfC, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene el gen "OrfC" de *Schizochytrium* ATCC 20888) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7650. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pJK1131 OrfC, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

25 Un clon genómico descrito en el presente documento como clon genómico pBR002 OrfC, aislado de *Schizochytrium* sp. N230D, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. El clon genómico pBR002 (indicado como clon genómico pBR002 OrfC, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfC de *Schizochytrium* sp. N230D) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 8 de junio de 2006, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC PTA-7642. La secuencia de nucleótidos del clon genómico pBR002 OrfC, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

35 El primer dominio en OrfC es un dominio DH, también denominado en el presente documento ORFC-DH1. Éste es uno de dos dominios DH en OrfC, y se designa por tanto DH1. La secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio OrfC-DH1 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 27 (posiciones 1-1350 de SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio OrfC-DH1 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 28 (posiciones 1-450 de SEQ ID NO: 6).

40 El segundo dominio en OrfC es un dominio DH, también denominado en el presente documento ORFC-DH2. Éste es el segundo de dos dominios DH en OrfC, y por tanto se designa DH2. La secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio OrfC-DH2 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 29 (posiciones 1351-2847 de SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio OrfC-DH2 se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 30 (posiciones 451-949 de SEQ ID NO: 6). Este dominio DH comprende los aminoácidos H-G-I-A-N-P-T-F-V-H-A-P-G-K-I (SEQ ID NO: 100; posiciones 876-890 de SEQ ID NO: 6) en las posiciones 426-440 de SEQ ID NO: 30.

50 El tercer dominio en OrfC es un dominio ER, también denominado en el presente documento ORFC-ER, y la secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia que codifica para el dominio OrfC-ER se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 31 (posiciones 2995-4506 de SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio OrfC-ER se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 32 (posiciones 999-1502 de SEQ ID NO: 6)

Sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium*

55 En una realización, un sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium* comprende al menos los siguientes dominios biológicamente activos: (a) dos dominios enoil-ACP reductasa (ER); (b) entre cinco y diez o más dominios de proteína transportadora de acilo (ACP), y en un aspecto, ocho dominios ACP; (c) dos dominios de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (d) un dominio de aciltransferasa (AT); (e) un dominio de β -cetoacil-ACP reductasa (KR); (f) dos dominios de β -hidroxilacil-ACP deshidrasa (DH) similares a FabA; (g) un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); y (h) un dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT). En una realización, un sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium* según la presente invención también comprende al menos una región o un dominio que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) que no es una parte de un dominio DH similar a FabA. Las características estructurales y funcionales de estos dominios se conocen generalmente de manera individual en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2004035127, citada anteriormente).

Hay tres marcos de lectura abiertos que forman el sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium* 23B central descrito anteriormente. La estructura de dominios de cada marco de lectura abierto es tal como sigue.

Marco de lectura abierto A (OrfA) de *Thraustochytrium* 23B:

5 La secuencia de nucleótidos completa para OrfA de *Th.* 23B se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 38. OrfA de *Th.* 23B es una secuencia de 8433 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 2811 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 39. SEQ ID NO: 38 codifica para los siguientes dominios en OrfA de *Th.* 23B: (a) un dominio de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (b) un dominio malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT); (c) ocho dominios de proteína transportadora de acilo (ACP); y (d) un dominio β -cetoacil-ACP reductasa (KR).

15 Dos clones genómicos descritos en el presente documento como Th23BOrfA_pBR812.1 y Th23BOrfA_pBR811 (clones genómicos de OrfA), aislados de *Thraustochytrium* 23B, juntos (clones solapantes) comprenden, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 38, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. El clon genómico Th23BOrfA_pBR812.1 (indicado como clon genómico Th23BOrfA_pBR812.1, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfA de *Thraustochytrium* 23B) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 1 de marzo de 2007, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC
20 _____. La secuencia de nucleótidos de Th23BOrfA_pBR812.1, un clon genómico de OrfA, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención. El clon genómico Th23BOrfA_pBR811 (indicado como clon genómico Th23BOrfA_pBR811, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfA de *Thraustochytrium* 23B) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 1 de marzo de 2007, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC
25 _____. La secuencia de nucleótidos de Th23BOrfA_pBR811, un clon genómico de OrfA, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

30 El primer dominio en OrfA de *Th.* 23B es un dominio KS, también denominado en el presente documento OrfA-KS de *Th.* 23B, y está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 1500 de SEQ ID NO: 38, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 40. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio KS de *Th.* 23B es una región de SEQ ID NO: 39 que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 500 de SEQ ID NO: 39, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 41. Esta región de SEQ ID NO: 39 tiene una coincidencia de Pfam con FabB (β -cetoacil-ACP sintasa) que abarca de desde la posición 1 hasta aproximadamente la posición 450 de SEQ ID NO: 39 (también posiciones 1 a aproximadamente 450 de SEQ ID NO: 41). Se observa que el dominio OrfA-KS de *Th.* 23B contiene un motivo de sitio activo: DXAC* (*sitio de unión a acilo C₂₀₇). Además, un motivo característico en el extremo de la región KS de *Th.* 23B, GFGG, está presente en las posiciones 453-456 de SEQ ID NO: 39 (también posiciones 453-456 de SEQ ID NO: 41).

40 El segundo dominio en OrfA de *Th.* 23B es un dominio MAT, también denominado en el presente documento OrfA-MAT de *Th.* 23B, y está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1503 hasta aproximadamente la posición 3000 de SEQ ID NO: 38, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 42. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio MAT de *Th.* 23B es una región de SEQ ID NO: 39 que abarca de desde aproximadamente la posición 501 hasta aproximadamente la posición 1000, representada en el presente documento por SEQ ID NO: 43. Esta región de SEQ ID NO: 39 tiene una coincidencia de Pfam con FabD (malonil-CoA:ACP aciltransferasa) que abarca de desde aproximadamente la posición 580 hasta aproximadamente la posición 900 de SEQ ID NO: 39 (posiciones 80-400 de SEQ ID NO: 43). Se observa que el dominio OrfA-MAT de *Th.* 23B contiene un motivo de sitio activo: GHS*_{XG} (*sitio de unión a acilo S₆₉₇), representado por las posiciones 695-699 de SEQ ID NO: 39.

55 Los dominios 3-10 de OrfA de *Th.* 23B son ocho dominios ACP en tándem, también denominados en el presente documento OrfA-ACP de *Th.* 23B (el primer dominio en la secuencia es OrfA-ACP1, el segundo dominio es OrfA-ACP2, el tercer dominio es OrfA-ACP3, etc.). El primer dominio ACP de *Th.* 23B, OrfA-ACP1 de *Th.* 23B, está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 3205 hasta aproximadamente la posición 3555 de SEQ ID NO: 38 (OrfA), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 44. La secuencia de aminoácidos que contiene el primer dominio ACP de *Th.* 23B es una región de SEQ ID NO: 39 que abarca de desde aproximadamente la posición 1069 hasta aproximadamente la posición 1185 de SEQ ID NO: 39, representada en el presente documento por SEQ ID NO: 45.

60 Los ocho dominios ACP en OrfA de *Th.* 23B son adyacentes entre sí y pueden identificarse por la presencia del motivo de sitio de unión a fosfopanteteína, LGXDS* (representado por SEQ ID NO: 46), en el que la S* es el sitio de acoplamiento de fosfopanteteína. La posición de aminoácido de cada uno de los ocho sitios S*, con referencia a SEQ ID NO: 39, son 1128 (ACP1), 1244 (ACP2), 1360 (ACP3), 1476 (ACP4), 1592 (ACP5), 1708 (ACP6), 1824 (ACP7) y 1940 (ACP8). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los ocho dominios ACP de *Th.* 23B están altamente conservadas y, por tanto, la secuencia para cada dominio no se representa en el presente documento por
65

un identificador de secuencia individual. Sin embargo, basándose en la información dada a conocer en el presente documento, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la secuencia que contiene cada uno de los otros siete dominios ACP en SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39.

- 5 Los ocho dominios ACP de *Th. 23B* juntos abarcan una región de OrfA de *Th. 23B* de desde aproximadamente la posición 3205 hasta aproximadamente la posición 5994 de SEQ ID NO: 38, que corresponde a las posiciones de aminoácido de desde aproximadamente 1069 hasta aproximadamente 1998 de SEQ ID NO: 39. La secuencia de nucleótidos para toda la región ACP que contiene los ocho dominios se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 47. SEQ ID NO: 47 codifica para una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEQ ID NO: 48. SEQ ID NO: 48 incluye los segmentos de ligador entre dominios ACP individuales. El intervalo de repetición para los ocho dominios es aproximadamente cada 116 aminoácidos de SEQ ID NO: 48, y puede considerarse que cada dominio consiste en aproximadamente 116 aminoácidos centrados en el motivo de sitio activo (descrito anteriormente).
- 10
- 15 El último dominio en OrfA de *Th. 23B* es un dominio KR, también denominado en el presente documento OrfA-KR de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 6001 hasta aproximadamente la posición 8433 de SEQ ID NO: 38, representada en el presente documento por SEQ ID NO: 49. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio KR de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 39 que abarca de desde aproximadamente la posición 2001 hasta aproximadamente la posición 2811 de SEQ ID NO: 39, representada en el presente documento por SEQ ID NO: 50. Esta región de SEQ ID NO: 39 tiene una coincidencia de Pfam con FabG (β -cetoacil-ACP reductasa) que abarca de desde aproximadamente la posición 2300 hasta aproximadamente 2550 de SEQ ID NO: 39 (posiciones 300-550 de SEQ ID NO: 50).
- 20

Marco de lectura abierto B (OrfB) de *Thraustochytrium 23B*:

- 25 La secuencia de nucleótidos completa para OrfB de *Th. 23B* se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 51, que es una secuencia de 5805 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 1935 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 52. SEQ ID NO: 51 codifica para los siguientes dominios en OrfB de *Th. 23B*: (a) un dominio de β -cetoacil-ACP sintasa (KS); (b) un dominio de factor de longitud de cadena (CLF); (c) un dominio de aciltransferasa (AT); y (d) un dominio de enoil-ACP reductasa (ER).
- 30

- Un clon genómico descrito en el presente documento como Th23BOrfB_pBR800 (clon genómico de OrfB), aislado de *Thraustochytrium 23B*, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 51, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52. El clon genómico Th23BOrfB_pBR800 (indicado como clon genómico Th23BOrfB_pBR800, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfB de *Thraustochytrium 23B*) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 1 de marzo de 2007, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC _____. La secuencia de nucleótidos de Th23BOrfB_pBR800, un clon genómico de OrfB, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.
- 35
- 40

- El primer dominio en el OrfB de *Th. 23B* es un dominio KS, también denominado en el presente documento OrfB-KS de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 1500 de SEQ ID NO: 51 (OrfB de *Th. 23B*), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 53. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio KS de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 52 que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 500 de SEQ ID NO: 52, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 54. Esta región de SEQ ID NO: 52 tiene una coincidencia de Pfam con FabB (β -cetoacil-ACP sintasa) que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 450 (posiciones 1-450 de SEQ ID NO: 54). Se observa que el dominio OrfB-KS de *Th. 23B* contiene un motivo de sitio activo: DXAC*, en el que C* es el sitio de acoplamiento a grupo acilo y en el que la C* está en la posición 201 de SEQ ID NO: 52. Además, un motivo característico en el extremo de la región KS, GFGG, está presente en las posiciones de aminoácido 434-437 de SEQ ID NO: 52.
- 45
- 50

- 55 El segundo dominio en OrfB de *Th. 23B* es un dominio CLF, también denominado en el presente documento OrfB-CLF de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1501 hasta aproximadamente la posición 3000 de SEQ ID NO: 51 (OrfB), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 55. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio CLF es una región de SEQ ID NO: 52 que abarca de desde aproximadamente la posición 501 hasta aproximadamente la posición 1000 de SEQ ID NO: 52, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 56. Esta región de SEQ ID NO: 52 tiene una coincidencia de Pfam con FabB (β -cetoacil-ACP sintasa) que abarca de desde aproximadamente la posición 550 hasta aproximadamente la posición 910 (posiciones 50-410 de SEQ ID NO: 56). Aunque CLF tiene homología con proteínas KS, carece de una cisteína de sitio activo a la que se acopla el grupo acilo en proteínas KS.
- 60
- 65

El tercer dominio en OrfB de *Th. 23B* es un dominio AT, también denominado en el presente documento OrfB-AT de

5 *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 3001 hasta aproximadamente la posición 4500 de SEQ ID NO: 51 (OrfB de *Th. 23B*), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 58. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio AT de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 52 que abarca de desde aproximadamente la posición 1001 hasta aproximadamente la posición 1500 de SEQ ID NO: 52, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 58. Esta región de SEQ ID NO: 52 tiene una coincidencia de Pfam con FabD (malonil-CoA:ACP aciltransferasa) que abarca de desde aproximadamente la posición 1100 hasta aproximadamente la posición 1375 (posiciones 100-375 de SEQ ID NO: 58). Aunque este dominio AT de las AGPI sintetas tiene homología con proteínas MAT, carece del motivo extendido del MAT (residuos arginina y glutamina clave) y no se piensa que esté implicado en transferencias de malonil-CoA. 10 Está presente el motivo GXS**XG* de aciltransferasas, siendo la S* el sitio de acoplamiento a acilo y estando ubicada en la posición 1123 con respecto a SEQ ID NO: 52.

15 El cuarto dominio en OrfB de *Th. 23B* es un dominio ER, también denominado en el presente documento OrfB-ER de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 4501 hasta aproximadamente la posición 5805 de SEQ ID NO: 51 (OrfB), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 59. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ER de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 52 que abarca de desde aproximadamente la posición 1501 hasta aproximadamente la posición 1935 de SEQ ID NO: 52, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 60. Esta región de SEQ ID NO: 52 tiene una coincidencia de Pfam con una familia de dioxigenasas relacionadas con 2-nitropropano 20 dioxigenasas que abarca de desde aproximadamente la posición 1501 hasta aproximadamente la posición 1810 (posiciones 1-310 de SEQ ID NO: 60). Puede predecirse adicionalmente que este dominio funciona como una ER debido a la homología con una enzima ER recién caracterizada de *Streptococcus pneumoniae*.

25 Marco de lectura abierto C (OrfC) de *Thraustochytrium 23B*:

La secuencia de nucleótidos completa para OrfC de *Th. 23B* se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 61, que es una secuencia de 4410 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) que codifica para una secuencia de 1470 aminoácidos, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 62. SEQ ID NO: 61 codifica para los siguientes dominios en OrfC de *Th. 23B*: (a) dos dominios de β -hidroxiacil-ACP deshidrasa (DH) 30 similares a FabA, ambos con homología con la proteína FabA (una enzima que cataliza la síntesis de trans-2-decenoil-ACP y la isomerización reversible de este producto a cis-3-decenoil-ACP); y (b) un dominio de enoil-ACP reductasa (ER) con alta homología con el dominio ER de OrfB de *Schizochytrium*.

35 Un clon genómico descrito en el presente documento como Th23BOrfC_pBR709A (clon genómico de OrfC), aislado de *Thraustochytrium 23B*, comprende, según el mejor entender de los presentes inventores, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 61, y codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62. El clon genómico Th23BOrfC_pBR709A (indicado como clon genómico Th23BOrfC_pBR709A, en forma de un vector de plásmido de *E. coli* que contiene la secuencia del gen OrfC de *Thraustochytrium 23B*) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EE.UU. el 1 de marzo de 2007, y se le asignó el n.º de registro de la ATCC _____. 40 La secuencia de nucleótidos de Th23BOrfC_pBR709A, un clon genómico de OrfC, y la secuencia de aminoácidos codificada por este plásmido se abarcan por la presente invención.

45 El primer dominio en OrfC de *Th. 23B* es un dominio DH, también denominado en el presente documento OrfC-DH1 de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 1500 de SEQ ID NO: 61 (OrfC), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 63. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio DH1 de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 62 que abarca de desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición 500 de SEQ ID NO: 62, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 64. Esta región de SEQ ID NO: 50 62 tiene una coincidencia de Pfam con FabA, tal como se mencionó anteriormente, que abarca de desde aproximadamente la posición 275 hasta aproximadamente la posición 400 (posiciones 275-400 de SEQ ID NO: 64).

55 El segundo dominio en OrfC de *Th. 23B* es también un dominio DH, también denominado en el presente documento OrfC-DH2 de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 1501 hasta aproximadamente 3000 de SEQ ID NO: 61 (OrfC), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 65. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio DH2 de *Th. 23B* es una región de SEQ ID NO: 62 que abarca de desde aproximadamente la posición 501 hasta aproximadamente la posición 1000 de SEQ ID NO: 62, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 66. Esta región de SEQ ID NO: 62 tiene una coincidencia de Pfam con FabA, tal como se mencionó anteriormente, que abarca de desde aproximadamente la posición 800 hasta aproximadamente la posición 925 (posiciones 300-425 de SEQ ID NO: 66). 60

65 El tercer dominio en OrfC de *Th. 23B* es un dominio ER, también denominado en el presente documento OrfC-ER de *Th. 23B*, que está contenido dentro de la secuencia de nucleótidos que abarca de desde aproximadamente la posición 3001 hasta aproximadamente la posición 4410 de SEQ ID NO: 61 (OrfC), representada en el presente documento como SEQ ID NO: 67. La secuencia de aminoácidos que contiene el dominio ER de *Th. 23B* es una

región de SEQ ID NO: 62 que abarca de desde aproximadamente la posición 1001 hasta aproximadamente la posición 1470 de SEQ ID NO: 62, representada en el presente documento como SEQ ID NO: 68. Esta región de SEQ ID NO: 62 tiene una coincidencia de Pfam con las dioxigenasas relacionadas con 2-nitropropano dioxigenasas, tal como se mencionó anteriormente, que abarca de desde aproximadamente la posición 1025 hasta aproximadamente la posición 1320 (posiciones 25-320 de SEQ ID NO: 68). También puede predecirse que este dominio funciona como una ER debido a la homología con una enzima ER recién caracterizada de *Streptococcus pneumoniae*.

PKS de AGPI de *Shewanella japonica*

Hay cinco marcos de lectura abiertos que forman el sistema de PKS de AGPI central de *Shewanella japonica* y su PPTasa descritos anteriormente. La estructura de dominios de cada marco de lectura abierto es tal como sigue.

SEQ ID NO: 69 es la secuencia de nucleótidos para el cósmido 3F3 de *Shewanella japonica* y se encuentra que contiene 15 ORF. Los ORF relacionados con el sistema de PKS de AGPI en este microorganismo se caracterizan tal como sigue.

pfaA (nucleótidos 10491-18854 de SEQ ID NO: 69) codifica para PFAS A (SEQ ID NO: 70), una proteína PKS de AGPI que alberga los siguientes dominios: β -cetoacil-sintasa (KS) (nucleótidos 10575-12029 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 29-513 de SEQ ID NO: 70); malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT) (nucleótidos 12366-13319 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 625-943 de SEQ ID NO: 70); seis dominios de proteína transportadora de acilo (ACP) en tándem (nucleótidos 14280-16157 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 1264-1889 de SEQ ID NO: 70); β -cetoacil-ACP reductasa (KR) (nucleótidos 17280-17684 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 2264-2398 de SEQ ID NO: 70); y una región de la proteína PFAS A entre los aminoácidos 2399 y 2787 de SEQ ID NO: 70 que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) LxxHxxxGxxxxP (aminoácidos 2504-2516 de SEQ ID NO: 70), denominado en el presente documento región de motivo de DH.

En PFAS A, se ubica un sitio activo de KS DXAC* en los aminoácidos 226-229 de SEQ ID NO: 70 siendo la C* el sitio de acoplamiento a acilo. Un sitio activo de MAT, GHS**XG*, se ubica en los aminoácidos 721-725 de SEQ ID NO: 70, siendo la S* el sitio de unión a acilo. Los sitios activos de ACP de LGXDS* se ubican en las siguientes posiciones: aminoácidos 1296-1300, aminoácidos 1402-1406, aminoácidos 1513-1517, aminoácidos 1614-1618, aminoácidos 1728-1732 y aminoácidos 1843-1847 en SEQ ID NO: 70, siendo la S* el sitio de acoplamiento a fosfopanteteína. Entre los aminoácidos 2399 y 2787 de SEQ ID NO: 70, la PFAS A también contiene el motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) LxxHxxxGxxxxP (aminoácidos 2504-2516 de SEQ ID NO: 70) al que se hizo referencia anteriormente.

pfaB (nucleótidos 18851-21130 de SEQ ID NO: 69) codifica para PFAS B (SEQ ID NO: 71), una proteína PKS de AGPI que alberga el siguiente dominio: aciltransferasa (AT) (nucleótidos 19982-20902 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 378-684 de SEQ ID NO: 71).

En PFAS B, se ubica un motivo GXS**XG* de sitio activo en los aminoácidos 463-467 de SEQ ID NO: 71, siendo la S* el sitio de acoplamiento a acilo.

pfaC (nucleótidos 21127-27186 de SEQ ID NO: 69) codifica para PFAS C (SEQ ID NO: 72), una proteína PKS de AGPI que alberga los siguientes dominios: KS (nucleótidos 21139-22575 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 5-483 de SEQ ID NO: 72); factor de longitud de cadena (CLF) (nucleótidos 22591-23439 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 489-771 de SEQ ID NO: 72); y dos FabA 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa, denominadas DH1 (nucleótidos 25408-25836 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 1428-1570 de SEQ ID NO: 72) y DH2 (nucleótidos 26767-27183 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 1881-2019 de SEQ ID NO: 72).

En PFAS C, se ubica un sitio activo de KS DXAC* en los aminoácidos 211-214 de SEQ ID NO: 72 siendo la C* el sitio de acoplamiento a acilo.

pfaD (nucleótidos 27197-28825 de SEQ ID NO: 69) codifica para la PFAS D (SEQ ID NO: 73), una proteína PKS de AGPI que alberga el siguiente dominio: una enoil reductasa (ER) (nucleótidos 27446-28687 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 84-497 de SEQ ID NO: 73).

pfaE (nucleótidos 6150-7061 de SEQ ID NO: 69 en la hebra complementaria inversa) codifica para PFAS E (SEQ ID NO: 74), una 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) con el dominio identificado (nucleótidos 6504-6944 de SEQ ID NO: 69, aminoácidos 40-186 de SEQ ID NO: 74).

PKS de AGPI de *Shewanella olleyana*

Hay cinco marcos de lectura abiertos que forman el sistema de PKS de AGPI central de *Shewanella olleyana* y su PPTasa descritos anteriormente. La estructura de dominios de cada marco de lectura abierto es tal como sigue.

SEQ ID NO: 75 es la secuencia de nucleótidos para el cósmido 9A10 de *Shewanella olleyana* y se encontró que contenía 17 ORF. Los ORF relacionados con el sistema de PKS de AGPI en este microorganismo se caracterizan tal como sigue.

5 pfaA (nucleótidos 17437-25743 de SEQ ID NO: 75) codifica para PFAS A (SEQ ID NO: 76), una proteína PKS de AGPI que alberga los siguientes dominios: β -cetoacil-sintasa (KS) (nucleótidos 17521-18975 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 29-513 de SEQ ID NO: 76); malonil-CoA:ACP aciltransferasa (MAT) (nucleótidos 19309-20265 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 625-943 de SEQ ID NO: 76); seis dominios de proteínas transportadoras de acilo (ACP) en tándem (nucleótidos 21259-23052 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 1275-1872 de SEQ ID NO: 76); β -cetoacil-ACP reductasa (KR) (nucleótidos 24154-24558 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 2240-2374 de SEQ ID NO: 76); y una región de la proteína PFAS A entre los aminoácidos 2241 y 2768 de SEQ ID NO: 76 que contiene un motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) LxxHxxxGxxxxP (aminoácidos 2480-2492 de SEQ ID NO: 76), denominados en el presente documento región de motivo de DH.

15 En PFAS A, se ubica un sitio activo de KS DXAC* en los AA 226-229 de SEQ ID NO: 76 siendo la C* el sitio del acoplamiento a acilo. Un sitio activo de MAT, GHS**XG*, se ubica en los aminoácidos 721-725 de SEQ ID NO: 76 siendo la S* el sitio de unión a acilo. Los sitios activos de ACP de LGXDS* se ubican en: aminoácidos 1307-1311, aminoácidos 1408-1412, aminoácidos 1509-1513, aminoácidos 1617-1621, aminoácidos 1721-1725 y aminoácidos 1826-1830 en SEQ ID NO: 76, siendo la S* el sitio de acoplamiento a fosfopanteteína. Entre los aminoácidos 2241 y 2768 de SEQ ID NO: 76, la PFAS A también contiene el motivo de sitio activo conservado de deshidratasa (DH) LxxHxxxGxxxxP (aminoácidos 2480-2492 de SEQ ID NO: 76) al que se hizo referencia anteriormente.

25 pfaB (nucleótidos 25740-27971 de SEQ ID NO: 75) codifica para PFAS B (SEQ ID NO: 77), una proteína PKS de AGPI que alberga el siguiente dominio: aciltransferasa (AT) (nucleótidos 26837-27848 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 366-703 de SEQ ID NO: 77).

En PFAS B, se ubica un motivo GXS**XG* de sitio activo en los aminoácidos 451-455 de SEQ ID NO: 77 siendo la S* el sitio de acoplamiento a acilo.

30 pfaC (nucleótidos 27968-34030 de SEQ ID NO: 75) codifica para PFAS C (SEQ ID NO: 78), una proteína PKS de AGPI que alberga los siguientes dominios: KS (nucleótidos 27995-29431 SEQ ID NO: 75, aminoácidos 10-488 SEQ ID NO: 78); factor de longitud de cadena (CLF) (nucleótidos 29471-30217 SEQ ID NO: 75, aminoácidos 502-750 SEQ ID NO: 78); y dos FabA 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa, denominadas DH1 (nucleótidos 32258-32686 SEQ ID NO: 75, aminoácidos 1431-1573 SEQ ID NO: 78) y DH2 (nucleótidos 33611-34027 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 1882-2020 de SEQ ID NO: 78).

En PFAS C, se ubica un sitio activo de KS DXAC* en los aminoácidos 216-219 de SEQ ID NO: 78 siendo la C* el sitio de acoplamiento a acilo.

40 pfaD (nucleótidos 34041-35669 de SEQ ID NO: 75) codifica para la PFAS D (SEQ ID NO: 79), una proteína PKS de AGPI que alberga el siguiente dominio: una enoil reductasa (ER) (nucleótidos 34290-35531 de SEQ ID NO: 75, aminoácidos 84-497 de SEQ ID NO: 79).

45 pfaE (nucleótidos 13027-13899 de SEQ ID NO: 75 en la hebra complementaria inversa) codifica para PFAS E (SEQ ID NO: 80), una 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) con el dominio identificado (los nucleótidos 13369-13815 de SEQ ID NO: 75, aminoácido 29-177 de SEQ ID NO: 80).

Otras secuencias de PKS de AGPI, incluyendo secuencias de PKS de AGPI optimizadas

50 La invención incluye diversas secuencias optimizadas para su uso en la expresión de sistemas de PKS de AGPI en huéspedes heterólogos, ejemplos de las cuales se proporcionan a continuación. Un experto en la técnica podrá producir secuencias optimizadas, en particular, secuencias optimizadas para un uso de codones preferido o una mejor expresión y función en un huésped heterólogo.

55 sOrfA

SEQ ID NO: 35, indicada como sOrfA, representa la secuencia de ácido nucleico que codifica para OrfA de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 1) que se ha resintetizado para el uso de codones optimizado en levadura. SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 35 codifican cada una para SEQ ID NO: 2.

60 sOrfB

SEQ ID NO: 36, indicada como sOrfB, representa la secuencia de ácido nucleico que codifica para OrfB de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 3) que se ha resintetizado para el uso de codones optimizado en levadura. SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 36 codifican cada una para SEQ ID NO: 4.

65

OrfB*

SEQ ID NO: 37, indicada como OrfB*, representa una secuencia de ácido nucleico que codifica para OrfB de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 4) que se ha resintetizado dentro de una porción de SEQ ID NO: 3 para su uso en células de plantas, y que se derivó de una secuencia muy similar desarrollada inicialmente para el uso de codones optimizado en *E. coli*, también denominada OrfB*. OrfB* en ambas formas (para *E. coli* y para plantas) es idéntica a SEQ ID NO: 3 con la excepción de un BspHI resintetizado (nucleótido 4415 de SEQ ID NO: 3) para dar un fragmento SacII (sitio único en SEQ ID NO: 3). Ambas versiones (*E. coli* y planta) tienen otras dos modificaciones de codones cerca del inicio del gen en comparación con la secuencia genómica original de orfB (SEQ ID NO: 3). En primer lugar, el cuarto codón, arginina (R), se cambió de CGG en la secuencia genómica a CGC en orfB*. En segundo lugar, el quinto codón, asparagina (N), se cambió de AAT en la secuencia genómica a AAC en orfB*. Con el fin de facilitar la clonación de este gen en los vectores de plantas para crear SEQ ID NO: 37, también se modificó por ingeniería genética un sitio de PstI (CTGCAG) en la secuencia de orfB* de *E. coli* 20 bases a partir del inicio del gen. Este cambio no alteró la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Tanto SEQ ID NO: 37 como SEQ ID NO: 3 (así como la forma de OrfB* para *E. coli*) codifican para SEQ ID NO: 4.

Proteína auxiliar y diana adicional y estrategias para una producción y acumulación de AGPI mejoradas

Según la presente invención, un sistema de PKS de AGPI para la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo o para la producción y/o acumulación mejoradas de AGPI en un huésped endógeno, el sistema de PKS de AGPI preferiblemente hace uso de una o más de las diversas dianas o estrategias descritas anteriormente para la producción de AGPI (véanse las seis directrices y estrategias descritas anteriormente). Estas estrategias incluyen, entre otras cosas, el uso de diversas proteínas auxiliares, que se definen en el presente documento como proteínas que no se considera que son parte del sistema de PKS de AGPI central tal como se describió anteriormente (es decir, no parte del propio complejo enzimático de AGPI sintasa), pero que pueden ser, o son, necesarias para la producción de AGPI o al menos para la producción de AGPI eficaz usando el complejo enzimático de AGPI sintasa central de la presente invención. Estas estrategias también incluyen diversas modificaciones genéticas para aumentar el flujo de sustrato, malonil CoA, a través de la ruta de AGPI sintasa potenciando su capacidad para competir por la(s) reserva(s) de malonil-CoA. Se describen a continuación variaciones de estas realizaciones de la invención.

Fosfopanteteinil transferasa (PPTasa)

Tal como se comenta en las directrices y estrategias generales para la producción de AGPI en un huésped heterólogo anteriormente, con el fin de producir AGPI, un sistema de PKS de AGPI debe funcionar con una proteína auxiliar que transfiere un resto 4'-fosfopanteteinilo desde coenzima A al/a los dominio(s) de proteína transportadora de acilo (ACP). Por tanto, puede considerarse que un sistema de PKS de AGPI incluye al menos un dominio de 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), o un dominio de este tipo puede considerarse que es una proteína o un dominio auxiliar al sistema de PKS de AGPI. Las características estructurales y funcionales de PPTasas se han descrito en detalle, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995.

Según la presente invención, un dominio o una proteína que tiene actividad biológica (función) 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) se caracteriza como la enzima que transfiere un resto 4'-fosfopanteteinilo de la coenzima A a la proteína transportadora de acilo (ACP). Esta transferencia a un residuo de serina invariante de la ACP activa la apoforma inactiva a la holoforma. En la síntesis de tanto policétidos como ácidos grasos, el grupo fosfopanteteína forma tioésteres con las cadenas de acilo en crecimiento. Las PPTasas son una familia de enzimas que se han caracterizado bien en la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de policétidos y la síntesis de péptidos no ribosómica. Se conocen las secuencias de muchas PPTasas, y se han determinado las estructuras cristalinas (por ejemplo, Reuter K, Mofid MR, Marahiel MA, Ficner R. "Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily" EMBO J. 1 de diciembre de 1999; 18(23):6823-31) así como el análisis mutacional de residuos de aminoácido importantes para la actividad (Mofid MR, Finking R, Essen LO, Marahiel MA. "Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism" Biochemistry. 13 de abril de 2004; 43(14): 4128-36). Estos aminoácidos invariantes y altamente conservados en PPTasas están contenidos dentro de los ORF de pfaE de ambas cepas de *Shewanella* descritas anteriormente.

Una PPTasa heteróloga que se ha demostrado anteriormente que reconoce los dominios ACP de OrfA descritos en el presente documento como sustratos es la proteína Het I de *Nostoc* sp. PCC 7120 (anteriormente denominado *Anabaena* sp. PCC 7120). Het I está presente en una agrupación de genes en *Nostoc* que se sabe que son responsables de la síntesis de hidroxi-ácidos grasos de cadena larga que son un componente de la capa de glicolípidos presente en heterocistos de ese organismo (Black y Wolk, 1994, J. Bacteriol. 176, 2282-2292; Campbell et al., 1997, Arch. Microbiol. 167, 251-258). Es probable que Het I active los dominios ACP de una proteína, Hgl E, presente en esa agrupación. Los dos dominios ACP de Hgl E tienen un alto grado de homología de secuencia con los dominios ACP encontrados en Orf A de *Schizochytrium*. SEQ ID NO: 34 representa la secuencia de aminoácidos

de la proteína Het I de *Nostoc*, y es una PPTasa funcional que puede usarse con un sistema de PKS de AGPI descrito en el presente documento, incluyendo los sistemas de PKS de AGPI de *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*. SEQ ID NO: 34 se codifica por SEQ ID NO: 33. El codón de iniciación endógeno de Het I no se ha identificado (no hay ninguna metionina presente en la proteína supuesta). Hay varios posibles codones de iniciación alternativos (por ejemplo, TTG y ATT) cerca del extremo 5' del marco de lectura abierto. Ningún codón de metionina (ATG) está presente en la secuencia. Sin embargo, se completó la construcción de un constructo de expresión de Het I usando PCR para sustituir el posible codón de iniciación alternativo en 5' más lejano (TTG) por un codón de metionina (ATG, como parte de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción NdeI), e introduciendo un sitio de XhoI en el extremo 3' de la secuencia codificante, y se ha mostrado que la PPTasa codificada (SEQ ID NO: 34) es funcional.

Otra PPTasa heteróloga que se ha demostrado anteriormente que reconoce los dominios ACP de OrfA descritos en el presente documento como sustratos es *sfp*, derivada de *Bacillus subtilis*. *Sfp* se ha caracterizado bien, y se usa ampliamente debido a su capacidad para reconocer una amplia gama de sustratos. Basándose en la información de secuencia publicada (Nakana, *et al.*, 1992, Molecular and General Genetics 232: 313-321), se produjo previamente un vector de expresión para *sfp* clonando la región codificante, junto con secuencias de ADN flanqueantes en el sentido de 5' y en el sentido de 3' definidas, en un vector de clonación pACYC-184. Este constructo codifica para una PPTasa funcional tal como se demostró por su capacidad para coexpresarse con Orf A, B* y C de *Schizochytrium* en *E. coli* lo que, en condiciones apropiadas, dio como resultado la acumulación de DHA en esas células (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127).

Cuando se modifican genéticamente organismos (por ejemplo, microorganismos o plantas) para expresar un sistema de PKS de AGPI según la presente invención, algunos organismos huésped pueden expresar de manera endógena proteínas auxiliares que son necesarias para actuar con la PKS de AGPI para producir AGPI (por ejemplo, PPTasas). Sin embargo, algunos organismos pueden transformarse con moléculas de ácido nucleico que codifican para una o más proteínas auxiliares descritas en el presente documento para permitir y/o potenciar la producción de AGPI por el organismo, aunque el organismo produzca de manera endógena una proteína auxiliar homóloga (es decir, algunas proteínas auxiliares heterólogas pueden funcionar más eficaz o eficientemente con las proteínas AGPI sintasas transformadas que la proteína auxiliar endógena de las células huésped). La presente invención proporciona un ejemplo de bacterias, levaduras y plantas que se han modificado genéticamente con el sistema de PKS de AGPI de la presente invención que incluye una PPTasa auxiliar.

Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un organismo o célula huésped modificado genéticamente (por ejemplo, un microorganismo o una planta, o células del mismo), en el que la célula huésped o el organismo se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI central tal como se describe en el presente documento, y también una PPTasa tal como se describe en el presente documento. Se describen PPTasas adecuadas anteriormente y también se describen en la técnica. La PPTasa puede expresarse en el mismo constructo o uno diferente como una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican para la proteína o proteínas de PKS de AGPI central. Ambas realizaciones se ilustran en los ejemplos (véanse los ejemplos 12 y 13). En un aspecto, la PPTasa es la HetI de *Nostoc* (representada en el presente documento mediante SEQ ID NO: 33 y 34).

En una realización de la invención, la producción y acumulación de AGPI se potencia reduciendo (inhibiendo, regulando por disminución, disminuyendo) la expresión o actividad de una PPTasa endógena expresada por una célula huésped o un organismo huésped (por ejemplo, para evitar la competición con la PPTasa introducida con las enzimas PKS de AGPI según esta realización). La inhibición de la actividad PPTasa endógena puede lograrse mediante cualquier método de delección o inactivación de genes adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de ARN antisentido, iARN, cosupresión o introducción de mutaciones).

La invención incluye la expresión de PPTasas exógenas (solas o en combinación con inhibición de PPTasas endógenas) conjuntamente con la expresión de una AGPI sintasa tal como se describe en el presente documento, que se utilizan solas o en combinación con una cualquiera o más estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco cualesquiera de: optimización de codones, direccionamiento a orgánulos, potenciación de la competición de AGPI sintasa por malonil CoA (por ejemplo, mediante inhibición de FAS), expresión de una acil CoA sintetasa y/o expresión de una o más aciltransferasas o enzimas relacionadas), para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo.

Modificaciones del flujo de malonil CoA/inhibición de FAS

Tal como se comentó anteriormente, el sustrato para el sistema de PKS de AGPI (AGPI sintasa), malonil-CoA, también se usa por sistemas de ácido graso sintasa (FAS), reacciones de elongación de ácidos grasos citoplasmáticos y otras enzimas (por ejemplo, chalcona sintasa). Por tanto, la AGPI sintasa compite con estos otros sistemas enzimáticos por el malonil-CoA. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a métodos y modificaciones genéticas para aumentar el flujo de malonil CoA a través de la ruta de AGPI sintasa potenciando la capacidad de las enzimas AGPI sintasa para competir por la(s) reserva(s) de malonil-CoA. Los métodos propuestos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, 1) la inhibición de rutas competidoras, incluyendo la inhibición de cualquier elemento en la ruta de FAS, por ejemplo, reduciendo los niveles de expresión de enzimas o

subunidades implicadas en esas rutas (por ejemplo, mediante el uso ARN antisentido, iARN, cosupresión o mutaciones), 2) la expresión de la AGPI sintasa en huéspedes heterólogos en los que las rutas competidoras se han reducido o bloqueado (por ejemplo, en canola en la que la capacidad para elongar ácidos grasos en el citoplasma se ha bloqueado) y/o 3) aumentando la reserva de malonil-CoA (por ejemplo, mediante la expresión de acetil-CoA carboxilasa).

Más específicamente, en un aspecto, la presente invención también incluye la modificación genética de organismos huésped que producen AGPI, y particularmente organismos huésped que expresan un sistema de PKS de AGPI heterólogo, para deletar o inactivar gen(es), o para reducir el nivel de actividad de enzimas codificadas por estos genes, que pueden competir con o interferir con la producción y/o acumulación de AGPI mediante el sistema de PKS de AGPI. Por ejemplo, los presentes inventores han encontrado que, reduciendo la actividad FAS en un organismo huésped que se ha transformado con un sistema de PKS de AGPI, la producción y acumulación de AGPI mejoran en comparación con organismos huésped que conservan el nivel normal de actividad FAS (véanse experimentos a modo de ejemplo en *Schizochytrium*, así como experimentos detallados para levaduras y plantas en los ejemplos).

En una realización, se prevén diversas enzimas que inhiben la producción de ácidos grasos a través de la ruta de FAS. Muchas enzimas pueden ser dianas adecuadas para esta realización de la invención, y dos dianas particularmente útiles se muestran a modo de ejemplo y se describen en detalle a continuación. Los inventores han demostrado la capacidad para desactivar una enzima FAS en *Schizochytrium* (véanse los ejemplos), y esta estrategia puede aplicarse a huéspedes heterólogos. En otra realización, los inventores han demostrado la capacidad para inhibir el sistema de FAS mediante métodos bioquímicos en un huésped de levadura, dando como resultado la producción de AGPI mejorada en levaduras que expresan una AGPI sintasa y una PPTasa, en comparación con la ausencia del direccionamiento bioquímico del sistema de FAS. Otros determinados huéspedes pueden ser propensos a estrategias similares.

Finalmente, en plantas, los presentes inventores han demostrado que la inhibición de la ruta de FAS mediante la inhibición de KasII o KasIII usando tecnología antisentido o de iARN mejora la producción de AGPI en huéspedes heterólogos que expresan una AGPI sintasa y una PPTasa. Aunque la invención no se limita a estas dianas particulares, es un aspecto de la invención seleccionar como diana una o ambas de estas enzimas para su inhibición conjuntamente con la expresión de una AGPI sintasa y PPTasa tal como se describe en el presente documento, sola o en combinación con otras estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, optimización de codones, direccionamiento a orgánulos, expresión de una acil CoA sintetasa y/o expresión de una o más aciltransferasas o enzimas relacionadas), para aumentar la producción de AGPI y/o su acumulación en un huésped heterólogo.

En semillas, los lípidos, principalmente en forma de triacilglicerol (TAG), se derivan de asimilados a través de una ruta enzimática complicada. Generalmente, se suministra carbono reducido a la semilla por medio del floema desde otras partes de la planta. En semillas de plantas la biosíntesis de TAG se lleva a cabo de manera intracelular dentro de diferentes orgánulos (Ohlrogge y Browse, 1995, *Plant Cell* 7: 957-970). Dentro de los plástidos, los precursores de carbono cortos se convierten en ácidos grasos de cadena larga mediante el complejo de ácido graso sintasa (FAS) soluble de tipo II (Slabas y Fawcett, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 169-191), que añade de manera reiterativa unidades de C2 a una cadena de acilo graso y prepara la cadena para la siguiente ronda de elongación. La condensación de ocho o nueve rondas de unidades de C2 produce los ácidos grasos C16 y C18 que caracterizan los lípidos de membrana. La actividad FAS inicial se realiza por la enzima codificada en el núcleo, dirigida a plástidos malonil-CoA:ACP transacilasa (MCAT), que transfiere el grupo malonilo de malonil-CoA a proteína transportadora de acilo (ACP) (Yasuno *et al.*, 2004, *Journal of Biological Chemistry* 292: 8242-8251). Esto forma el sustrato, malonil-ACP, que proporciona las unidades de C2 para la posterior elongación. La siguiente etapa en la síntesis se logra a través de la actividad catalítica de la β -cetoacil-proteína transportadora de acilo sintetasa III (KAS III) codificada en el núcleo, dirigida a plástidos, en la que la condensación de malonil-CoA en el donador, malonil-ACP, da como resultado butiril (C4)-ACP. Todas las extensiones posteriores de las cadenas de acilo activadas por ACP se llevan a cabo por las isozimas 3-cetoacil-proteína transportadora de acilo sintetasa I (KAS I) y β -cetoacil-proteína transportadora de acilo sintetasa II (KAS II) codificadas en el núcleo, dirigidas a plástidos. KAS I cataliza las reacciones de condensación que convierten C4-ACP en C16-ACP utilizando butiril (C4)- a miristoil (C14)-ACP como sustratos, y KAS II realiza la última etapa para producir estearoil (C18)-ACP utilizando palmitoil (C16)-ACP (Carlsson *et al.*, 2002, *Plant Journal* 29: 761-770). Por tanto, inhibiendo o atenuando la expresión de KasIII o KasII, puede lograrse la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos durante el desarrollo de la semilla.

En una realización, la invención incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende iARN que se dirige a o bien KasII o bien KasIII en la célula huésped. En una realización, la célula huésped es una célula vegetal. En una realización, la invención incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende una molécula antisentido que se dirige a o bien KasII o bien KasIII en la célula huésped. En una realización preferida, la célula huésped es una célula vegetal.

En una realización, la invención incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 122, que es iARN de KAS II con el intrón de CHSA tal como se describe en el ejemplo 13. En una realización, la invención

incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 124, que es iARN de KAS III con el intrón de CHSA tal como se describe en el ejemplo 13. En una realización, la invención incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 123, que es una secuencia de ácido nucleico antisentido de KAS II tal como se describe en el ejemplo 13. En una realización, la invención incluye la transformación de una célula o un organismo huésped heterólogo con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 125, que es una secuencia de ácido nucleico antisentido de KAS III tal como se describe en el ejemplo 13.

Los métodos adicionales para potenciar la capacidad de enzimas AGPI sintasa para competir por la(s) reserva(s) de malonil-CoA incluyen la expresión de la AGPI sintasa en huéspedes heterólogos en los que las rutas competidoras se han reducido o bloqueado (por ejemplo, en canola en la que la capacidad para elongar ácidos grasos en el citoplasma se ha bloqueado). Otros huéspedes heterólogos adecuados pueden seleccionarse (organismos y/o mutantes que se producen de manera natural identificados mediante selección, mutación al azar y selección, y/o mutación dirigida) mediante técnicas tales como labranza, cría, selección asistida por marcador, etc., para detectar rutas competidoras reducidas o bloqueadas, tales como rutas de FAS y similares.

Expresión de otras enzimas, tales como acetil-CoA carboxilasa, también puede aumentar la reserva de malonil CoA disponible para todos los sistemas enzimáticos, y por tanto mejorar el flujo a través del sistema de PKS de AGPI.

La invención incluye el establecimiento de cualquiera de las realizaciones para mejorar la capacidad de un sistema de PKS de AGPI para usar malonil CoA con la expresión de PPTasas exógenas (solas o en combinación con la inhibición de PPTasas endógenas) conjuntamente con la expresión de una AGPI sintasa tal como se describe en el presente documento, que se utilizan solas o en combinación con una cualquiera o más estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro cualesquiera de: optimización de codones, direccionamiento a orgánulos, expresión de una acil CoA sintetasa y/o expresión de una o más aciltransferasas o enzimas relacionadas), para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo.

30 Acil-CoA Sintetasa

Otra realización de la presente invención proporciona proteínas acil-CoA sintetasa (ACoAS) que catalizan la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.

Los presentes inventores han determinado que un productor endógeno de AGPI mediante el sistema de PKS de AGPI, *Schizochytrium*, presenta una o más ACoASs que pueden convertir los productos de AGL de su sistema de PKS de AGPI en acil-CoA. Esto es evidente por el hecho de que se acumulan altos niveles de AGPI en esas fracciones en este organismo. Por tanto, *Schizochytrium*, así como otros organismos que contienen de manera endógena un sistema de PKS de AGPI (por ejemplo, otros traustozoutridios) u otros eucariotas que producen AGPI (tales como *Thalassiosira pseudonana* o *Cryptocodinium cohnii*), representan fuentes excelentes para genes que codifican para enzimas que son útiles para permitir o aumentar la acumulación de los productos de un sistema de PKS de AGPI expresado en un huésped heterólogo.

Los presentes inventores han identificado en *Schizochytrium* nueve secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas con homología con proteínas con actividad acil-CoA sintetasa (ACoAS) conocida o sospechada. Los presentes inventores creen que una o varias de estas secuencias están asociadas con un gen que codifica para una ACoAS que puede convertir los productos de AGL de la AGPI sintasa de *Schizochytrium* en acil-CoA, y han demostrado la capacidad para usar varias de estas secuencias para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un organismo huésped. Como tales, serán de gran utilidad para aumentar la acumulación de AGPI en el huésped heterólogo en el que se expresa la AGPI sintasa de *Schizochytrium* u otra AGPI sintasa. Sin querer restringirse a la teoría, los presentes inventores creen que las ACoAS descubiertas por los presentes inventores son útiles para aumentar la acumulación de AGPI en huéspedes que expresan una AGPI sintasa con un perfil de productos similar al de *Schizochytrium*, así como en huéspedes que expresan una AGPI sintasa con un perfil de productos que es diferente al de la AGPI sintasa de *Schizochytrium*. De hecho, los ejemplos presentados en el presente documento demuestran que varias ACoAS de *Schizochytrium* aumentan la acumulación de AGPI en cepas de levadura que se han modificado genéticamente con un sistema de PKS de AGPI *Schizochytrium* y también en plantas que se han modificado genéticamente de manera similar. Además, se espera que las ACoAS de *Schizochytrium* sean eficaces en el reconocimiento del EPA producido por AGPI sintasas de otros organismos si ese EPA está presente como un AGL. Además, dada la divulgación proporcionada por la presente invención, los genes que codifican para ACoAS de otros organismos pueden identificarse y obtenerse para su uso en organismos huésped heterólogos que expresan esas AGPI sintasas. Cada una de estas proteínas ACoAS y los ácidos nucleicos que codifican para las mismas se abarcan por la presente invención, así como homólogos y fragmentos biológicamente activos de las mismas. Estas proteínas y moléculas de ácido nucleico se comentarán en detalle a continuación y en los ejemplos.

Una realización de la presente invención se refiere a una acil-CoA sintetasa (ACoAS) aislada que cataliza la

conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. En un aspecto de la invención, la ACoAS aislada se deriva de un organismo que expresa de manera endógena un sistema de PKS de AGPI (AGPI sintasa). Tales organismos incluyen, pero no se limitan a, un traustochytridio. En un aspecto, la ACoAS aislada se deriva de *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Ulkenia*. En otro aspecto, la ACoAS aislada se deriva de *Schizochytrium* ATCC 20888 o de *Schizochytrium sp.* cepa N230D, que es una cepa derivada de *Schizochytrium* ATCC 20888 mediante mutagénesis y selección para lograr una producción de aceite mejorada. En otro aspecto, puede usarse en la presente invención cualquier ACoAS que funcione conjuntamente con cualquier sistema de PKS de AGPI para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un organismo o célula huésped. La invención no se limita a esos ejemplos específicos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la ACoAS aislada se codifica por una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98. En otro aspecto, la ACoAS aislada se codifica por una secuencia de ácido nucleico degenerada que codifica para una proteína que está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98. En aún otro aspecto, la ACoAS aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 ó 99, o un homólogo de cualquiera de tales secuencias de aminoácidos (descritas a continuación), incluyendo cualquier fragmento o dominio biológicamente activo de tales secuencias. En una realización preferida, la ACoAS aislada comprende una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEQ ID NO: 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 ó 99, o un homólogo de tal secuencia de aminoácidos. En una realización más preferida, la ACoAS aislada comprende una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEQ ID NO: 83, 85, 87, 91 ó 97, o un homólogo de tal secuencia, prefiriéndose particularmente SEQ ID NO: 83, 85 ó 97. También se abarcan por la invención combinaciones de una cualquiera o más acil-CoA sintetasas.

La invención incluye la expresión de una o más acil-CoA sintetasas tal como se describe y se muestra a modo de ejemplo en el presente documento con una AGPI sintasa tal como se describe en el presente documento y con una PPTasa exógena (sola o en combinación con la inhibición de PPTasas endógenas), que se utilizan solas o en combinación con una cualquiera o más estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, una, dos, tres, o cuatro cualesquiera de: optimización de codones, direccionamiento a orgánulos, potenciación de la competición de AGPI sintasa por malonil CoA (por ejemplo, mediante inhibición de FAS) y/o expresión de una o más aciltransferasas o enzimas relacionadas), para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo.

Aciltransferasas

En referencia a otra estrategia para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo descrito anteriormente, otra realización de la presente invención proporciona proteínas aciltransferasa adicionales que utilizan AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG (por ejemplo, 3-glicerol-fosfato aciltransferasas (GPAT), ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAAT) y diacilglicerol aciltransferasas (DAGAT)) u otras aciltransferasas que pueden dar como resultado el enriquecimiento de AGPI en PL o TAG (por ejemplo, fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasas (PDAT)). La presente invención incluye tales proteínas aisladas y homólogos de las mismas, moléculas de ácido nucleico que codifican para tales proteínas, organismos modificados genéticamente que expresan tales proteínas y diversos métodos de uso de tales proteínas, particularmente para potenciar la producción y acumulación de AGPI en un organismo.

Además, los presentes inventores también dan a conocer en el presente documento enzimas que pueden utilizar AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG, y por tanto representan proteínas auxiliares adicionales que pueden usarse en organismos huésped heterólogos que expresan AGPI sintetasas para potenciar la acumulación de AGPI producido por las AGPI sintetasas. Las enzimas candidatas incluyen, pero no se limitan a, 3-glicerol-fosfato aciltransferasas (GPAT), ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAAT) y diacilglicerol aciltransferasas (DAGAT). Cada una de estas proteínas que utilizan acil-CoA y los ácidos nucleicos que codifican para las mismas se abarcan por la presente invención. Por ejemplo, se ha identificado una secuencia de ácido nucleico de *Schizochytrium* que se cree que codifica para una enzima que presenta actividad DAGAT (véase por ejemplo, ScDAGAT). Además, se han identificado secuencias de *Crypthecodinium cohnii* que se cree que codifican para enzimas que presentan actividad LPAAT o DAGAT, también descritas a continuación. Estas proteínas, homólogos biológicamente activos de las mismas y moléculas de ácido nucleico, así como otras proteínas aciltransferasa, homólogos de las mismas y moléculas de ácido nucleico, se abarcan por la presente invención y se comentarán ejemplos específicos en detalle a continuación.

Otra realización de la presente invención se refiere a una proteína aislada que utiliza AGPI-CoA como sustrato en la formación de PL o TAG (por ejemplo, 3-glicerol-fosfato aciltransferasas (GPAT), ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAAT) y diacilglicerol aciltransferasas (DAGAT)). Las proteínas preferidas incluyen cualquiera de las aciltransferasas seleccionadas de GPAT, LPAAT y DAGAT. En un aspecto, las proteínas aisladas se derivan de un organismo que expresa de manera endógena un sistema de PKS de AGPI (PKS sintasa) o al menos una ruta de biosíntesis para la producción de AGPI. Tales organismos incluyen, pero no se limitan a, un traustochytridio o *Crypthecodinium cohnii*. En un aspecto, la aciltransferasa aislada se deriva de *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Ulkenia*. En otro aspecto, la aciltransferasa aislada se deriva de *Schizochytrium* ATCC 20888 o de *Schizochytrium*

sp. cepa N230D. En otro aspecto, la aciltransferasa se deriva de *Crypthecodinium cohnii*. En otro aspecto, puede usarse en la presente invención cualquier aciltransferasa que funcione conjuntamente con cualquier sistema de PKS de AGPI para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un organismo o célula huésped. La invención no se limita a esos ejemplos específicos descritos en el presente documento.

5 En otro aspecto, la acil transferasa aislada está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 100, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 111, 112 ó 114-121. En otro aspecto, la aciltransferasa aislada está codificada por una secuencia de ácido nucleico degenerada que codifica para una proteína que está
10 codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 100, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 111, 112 ó 114-121. En aún otro aspecto, la aciltransferasa aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 101, 104, 107, 110 ó 113, o un homólogo de cualquiera de tales secuencias de aminoácidos (descritas a continuación), incluyendo cualquier fragmento o dominio biológicamente activo de tales secuencias. En una realización preferida, la aciltransferasa aislada comprende una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEQ ID NO: 101, 104, 107, 110 ó 113, o un
15 homólogo de tal secuencia de aminoácidos. En una realización más preferida, la aciltransferasa aislada comprende una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEQ ID NO: 101 ó 104, o un homólogo de tal secuencia, prefiriéndose particularmente SEQ ID NO: 101. También se abarcan combinaciones de aciltransferasas descritas en el presente documento para su uso en la presente invención.

20 En aún otro aspecto, la aciltransferasa aislada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:, o un homólogo de cualquiera de tales secuencias de aminoácidos (descritas a continuación), incluyendo cualquiera fragmento o dominio biológicamente activo de tales secuencias.

La invención incluye la expresión de una o más acil-CoA sintetetasas tal como se describe y se muestra a modo de
25 ejemplo en el presente documento con una AGPI sintasa tal como se describe en el presente documento y con una PPTasa exógena (sola o en combinación con la inhibición de PPTasas endógenas), que se utilizan solas o en combinación con una cualquiera o más estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, una, dos, tres, o cuatro cualesquiera de: optimización de codones, direccionamiento a orgánulos, potenciación de la competición de AGPI sintasa por malonil CoA (por ejemplo, mediante inhibición de FAS) y/o expresión de una acil CoA sintetasa),
30 para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo.

Expresión específica de orgánulo

En referencia a otra estrategia descrita anteriormente, una realización de la invención se refiere al direccionamiento
35 de la expresión de las enzimas AGPI sintasa, la PPTasa y/o una cualquiera o más de las proteínas auxiliares y/o modificaciones genéticas dirigidas a uno o más orgánulos del huésped. Por ejemplo, en una realización, la expresión del sistema de AGPI sintasa y la PPTasa se dirige al plástido de una planta. En otra realización, la expresión del sistema de AGPI sintasa y la PPTasa se dirige al citosol. En otra realización, la expresión del sistema de AGPI sintasa y la PPTasa se dirige tanto al plástido como al citosol de una planta. En cualquiera de estas realizaciones,
40 pueden dirigirse otras dianas al plástido o el citosol. En un aspecto, la expresión de una acil-CoA sintetasa se dirige al citosol, y en otra realización, tal expresión se dirige al plástido. En una realización, una acil-CoA sintetasa se dirige al citosol y otra acil-CoA sintetasa se dirige al plástido. Preferiblemente, se expresan acil-CoA sintetetasas en el citosol para convertir los ácidos grasos libres DHA y/o DPA en acil-CoA, que a su vez pueden utilizarse por las aciltransferasas. Las aciltransferasas se dirigen generalmente de manera cotraduccional al retículo endoplasmático.
45 La inhibición de sistemas de FAS, tal como mediante modificación genética para inhibir una o más enzimas del huésped, puede dirigirse al/a los mismo(s) orgánulo(s) en el/los que se expresa la AGPI sintasa.

Una secuencia de direccionamiento a plástido a modo de ejemplo se deriva de una acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus*, estando representada la secuencia de aminoácidos del péptido de direccionamiento codificado en el presente
50 documento por SEQ ID NO: 81. Se conocen en la técnica una variedad de otras secuencias de direccionamiento a plástido y pueden usarse en realizaciones en las que el huésped heterólogo es una planta o una célula vegetal, y en las que se desea el direccionamiento al plástido.

La invención incluye el uso de direccionamiento a orgánulos (por ejemplo, al plástido o cloroplasto en plantas) con la
55 expresión de una AGPI sintasa tal como se describe en el presente documento y con una PPTasa exógena (sola o en combinación con la inhibición de PPTasas endógenas), que se utilizan solas o en combinación con una cualquiera o más estrategias descritas en el presente documento (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro cualesquiera de: optimización de codones, potenciación de la competición de AGPI sintasa por malonil CoA (por ejemplo, mediante inhibición de FAS), expresión de una o más acil-CoA sintetetasas y/o expresión de una o más
60 aciltransferasas o enzimas relacionadas), para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en un huésped heterólogo.

El direccionamiento de productos génicos al plástido o cloroplasto se controla mediante una secuencia señal que se encuentra en el extremo amino terminal de diversas proteínas y que se escinde durante la importación produciendo
65 la proteína madura (por ejemplo con respecto al direccionamiento al cloroplasto véase, por ejemplo, Comai *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Estas secuencias señal pueden fusionarse con productos génicos

heterólogos para efectuar la importación de productos heterólogos al interior del cloroplasto (van den Broeck *et al.* Nature 313: 358-363 (1985)). Puede aislarse ADN que codifica para secuencias señal apropiadas a partir de los ADNc que codifican para la proteína RUBISCO, la proteína CAB, la enzima EPSP sintasa, la proteína GS2 y muchas otras proteínas que se sabe que se localizan en cloroplastos.

5 En diversas realizaciones de la invención, puede ser particularmente ventajoso dirigir la localización de las proteínas empleadas en la invención a un compartimento subcelular, por ejemplo, al plástido o cloroplasto. Las proteínas pueden dirigirse al cloroplasto incluyendo en sus extremos amino-terminales un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP). De manera similar, las proteínas pueden dirigirse al plástido incluyendo en sus extremos N-terminales un péptido de señalización o de tránsito al plástido.

15 Se conocen bien en la técnica proteínas dirigidas al cloroplasto que se producen de manera natural, sintetizadas como proteínas precursoras más grandes que contienen un péptido de direccionamiento al cloroplasto amino-terminal que dirige el precursor a la maquinaria de importación del cloroplasto. Los péptidos que se dirigen al cloroplasto se escinden generalmente por endoproteasas específicas ubicadas dentro del orgánulo cloroplasto, liberando así la proteína madura y preferiblemente la enzima activa del precursor al medio del cloroplasto. Los ejemplos de secuencias que codifican para péptidos que son adecuados para dirigir el direccionamiento del gen o el producto génico al cloroplasto o plástido de la célula vegetal incluyen la EPSPS CTP de petunia, la EPSPS CTP2 y el intrón de *Arabidopsis*, y otras conocidas por los expertos en la técnica. Tales secuencias de direccionamiento proporcionan la proteína expresada deseada que va a transferirse a la estructura celular en la que funciona lo más eficazmente, o transfiriendo la proteína expresada deseada a zonas de la célula en las que se concentran los procesos celulares necesarios para la función fenotípica deseada. Los ejemplos específicos de péptidos de direccionamiento al cloroplasto se conocen bien en la técnica e incluyen el péptido de tránsito ats1A de subunidad pequeña de ribulosa bifsosfato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana*, un péptido de tránsito EPSPS de *Arabidopsis thaliana* y un péptido de tránsito de subunidad pequeña de ribulosa bifsosfato carboxilasa de maíz *Zea*.

20 Se describe un péptido de tránsito optimizado, por ejemplo, por Van den Broeck *et al.*, "Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase", Nature, 313:358-363 (1985). Se dan a conocer secuencias señal procariotas y eucariotas, por ejemplo, por Michaelis *et al.* (1982) Ann. Rev. Microbiol. 36, 425. Los ejemplos adicionales de péptidos de tránsito que pueden usarse en la invención incluyen los péptidos de tránsito al cloroplasto tales como los descritos en Von Heijne *et al.*, Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126(1991); Mazur *et al.*, Plant Physiol. 85: 1110 (1987); Vorst *et al.*, Gene 65: 59 (1988). Chen & Jagendorf (J. Biol. Chem. 268: 2363-2367 (1993)) han descrito el uso de un péptido de tránsito al cloroplasto para la importación de un transgén heterólogo. Este péptido usado es el péptido de tránsito del gen de *rbcS* de *Nicotiana glumbaginifolia* (Poulsen *et al.* Mol. Gen. Genet. 205: 193-200 (1986)). Una CTP que ha funcionado en el presente documento para localizar proteínas heterólogas al cloroplasto se derivó de acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus*.

30 Un medio alternativo para localizar genes al cloroplasto o plástido incluye la transformación de cloroplastos o plástidos. Pueden producirse plantas recombinantes en las que sólo el ADN del cloroplasto se ha alterado para incorporar las moléculas previstas en esta solicitud. Se han conocido en la técnica promotores que funcionan en cloroplastos (Hanley-Bowden *et al.*, Trends in Biochemical Sciences 12:67-70, 1987). Se han descrito métodos y composiciones para obtener células que contienen cloroplastos en los que se ha insertado ADN heterólogo, por ejemplo por Daniell *et al.* (patente estadounidense n.º 5.693.507; 1997) y Maliga *et al.* (patente estadounidense n.º 5.451.513; 1995).

45 Combinaciones de estrategias

Según la presente invención, en la producción de un huésped heterólogo para la producción y acumulación de uno o más AGPI objetivo, pueden usarse una cualquiera o más (cualquier combinación) de las estrategias descritas en el presente documento para mejorar la producción y/o acumulación de AGPI en el huésped. De hecho, se anticipa que diversas combinaciones de estrategias serán aditivas o sinérgicas y proporcionan una producción y/o acumulación mejoradas de AGPI en comparación con en ausencia de una o más de tales estrategias. De hecho, los ejemplos proporcionan múltiples estrategias a modo de ejemplo, incluyendo una variedad de combinaciones de estrategias, para la producción de AGPI en un organismo huésped (tanto los que son huéspedes heterólogos como organismos que expresan de manera natural un sistema de PKS de AGPI).

55 Un organismo o célula huésped modificado genéticamente adecuado para la producción de AGPI según la presente invención tiene los siguientes atributos de base. El organismo o célula huésped expresa un sistema de PKS de AGPI, que incluye las enzimas de PKS de AGPI centrales tal como se describe en el presente documento y una PPTasa que es eficaz para producir AGPI cuando se usan con las enzimas de PKS de AGPI centrales. El sistema de PKS de AGPI y/o la PPTasa pueden producirse de manera endógena por el organismo o célula huésped, o expresarse como proteínas heterólogas en el huésped (por ejemplo, mediante tecnología recombinante). Las moléculas de ácido nucleico que codifican para las enzimas de PKS de AGPI centrales y/o la PPTasa pueden optimizarse para el uso de codones o una mejor expresión en el organismo o célula huésped. El organismo o célula huésped puede modificarse adicionalmente para expresar una, dos, tres o más acil-Co sintetetas, incluyendo cualquiera de las descritas en el presente documento o conocidas de otra forma en la técnica. El organismo o célula

huésped puede modificarse adicionalmente para expresar una, dos, tres o más aciltransferasas, incluyendo cualquiera de las descritas en el presente documento o conocidas de otra forma en la técnica. El organismo o célula huésped puede modificarse genéticamente de manera adicional (o seleccionarse o producirse de otra forma) para potenciar la capacidad del sistema de PKS de AGPI para competir por el sustrato, malonil CoA. En un aspecto, esto se logra mediante la selección de un organismo que tiene esta característica de manera natural o debido a una mutación natural, seleccionada o dirigida o mediante cría u otra técnica. En otro aspecto, esto se logra inhibiendo selectivamente una o más enzimas en la(s) ruta(s) que compiten con PKS de AGPI por malonil CoA, tal como el sistema de FAS. En cualquiera de las realizaciones, el direccionamiento de las proteínas de PKS de AGPI o auxiliares o modificaciones puede ser específico de orgánulo, tal como al plástido de plantas.

Algunas combinaciones preferidas para su uso en relación con un sistema de PKS de AGPI central y PPTasa incluyen, pero no se limitan a: (1) expresión de una, dos o más acil-CoA sintetetasas; (2) inhibición de FAS (por ejemplo, mediante la inhibición de KASII o KASIII); (3) combinación de la expresión de una, dos o más acil-CoA sintetetasas con inhibición de FAS (por ejemplo, mediante la inhibición de KASII o KASIII); (4) expresión de una, dos o más acil transferasas; (5) combinación de la expresión de una, dos o más acil-CoA sintetetasas; inhibición de FAS (por ejemplo, mediante la inhibición de KASII o KASIII); y expresión de una, dos o más aciltransferasas.

Algunas combinaciones de modificaciones a modo de ejemplo ilustradas en el presente documento en plantas (véase el ejemplo 13) incluyen la expresión de una PKS de AGPI (por ejemplo, de *Schizochytrium*) y una PPTasa heteróloga (por ejemplo, HetI de *Nostoc*) con:

(a) expresión de una acil-CoA sintetasa (se muestran a modo de ejemplo ACS-1 y ACS-2);

(b) inhibición de FAS (se muestran a modo de ejemplo la inhibición por iARN de KASII, molécula antisentido de KASII, iARN de KASIII y molécula antisentido de KASIII);

(c) combinación de expresión de una acil-CoA sintetasa con inhibición de FAS (se muestran a modo de ejemplo la expresión de ACS-1 con inhibición de FAS mediante cada uno de iARN de KASII, molécula antisentido de KASII, iARN de KASIII y molécula antisentido de KASIII);

(d) expresión de una aciltransferasa (se muestra a modo de ejemplo LPAAT-1);

(e) combinación de expresión de una aciltransferasa con expresión de una acil-CoA sintetasa y con inhibición de FAS (se muestra a modo de ejemplo la expresión de DAGAT-1 con la expresión de ACS-1, cada combinación con inhibición de FAS mediante iARN de KASII o molécula antisentido de KASIII);

(f) combinación de expresión de una aciltransferasa con expresión de dos acil-CoA sintetetasas y con inhibición de FAS (se muestra a modo de ejemplo la expresión de DAGAT-1 con la expresión de ACS-1, expresión de ACS-8, cada combinación con inhibición de FAS mediante iARN de KASII o molécula antisentido de KASIII);

(g) combinación de expresión de dos aciltransferasas con expresión de una acil-CoA sintetasa y con inhibición de FAS (se muestra a modo de ejemplo la expresión de DAGAT-1 y LPAAT-1 con la expresión de ACS-1, cada combinación con inhibición de FAS mediante iARN de KASII o molécula antisentido de KASIII); y

(h) combinación de expresión de dos aciltransferasas con expresión de dos acil-CoA sintetetasas y con inhibición de FAS (se muestra a modo de ejemplo la expresión de DAGAT-1 y LPAAT-1 con la expresión de ACS-1 y ACS-8, cada combinación con inhibición de FAS mediante iARN de KASII o molécula antisentido de KASIII).

Cualquier planta o célula vegetal que use estas combinaciones de modificaciones, o cualquier otra modificación o combinación de modificaciones descritas en el presente documento, se abarca por la invención. Además, cualquier organismo o célula huésped que use cualquier modificación o combinación de modificaciones descritas en el presente documento se abarca por la invención, como cualquier producto derivado de tal célula u organismos, incluyendo aceites que comprenden los AGPI objetivo. Todas estas realizaciones de la invención se aplican a la discusión de cualquiera de los organismos modificados genéticamente y métodos de producción y uso de tales organismos tal como se describe en el presente documento.

Organismos, células modificados genéticamente, y métodos de producción y uso de los mismos

Para producir rendimientos significativamente altos de uno o más ácidos grasos poliinsaturados deseados u otras moléculas bioactivas, puede modificarse genéticamente un organismo, preferiblemente un microorganismo o una planta, para alterar la actividad y particularmente, el producto final, del sistema de PKS de AGPI en el microorganismo o planta o para introducir un sistema de PKS de AGPI en el microorganismo o la planta. La presente invención se refiere a métodos para mejorar o potenciar la eficacia de tal modificación genética y particularmente, para mejorar o potenciar la producción y/o acumulación del producto final de un sistema de PKS de AGPI, preferiblemente AGPI.

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a un organismo modificado genéticamente, en la que el organismo expresa un sistema de PKS de AGPI, y en la que el organismo se ha modificado genéticamente para expresar una proteína auxiliar tal como se describe en el presente documento para la mejora de la producción y/o acumulación de AGPI (u otros productos bioactivos del sistema de PKS de AGPI) por el huésped, y/o en la que el organismo se ha modificado genéticamente mediante cualquier método, incluyendo selección natural y mutación, para potenciar la capacidad de la PKS de AGPI para competir por sustrato dentro del huésped (por ejemplo, mediante inhibición de rutas de FAS y otras rutas competidoras descritas en el presente documento). Si el sistema de PKS de AGPI es heterólogo para el huésped, entonces el organismo también se modifica genéticamente de manera preferible para expresar una PPTasa como una proteína auxiliar de PKS de AGPI, que se describe en detalle anteriormente. En una realización, el organismo se ha modificado genéticamente para expresar una ACoAS descrita en el presente documento, y preferiblemente una ACoAS que se deriva del mismo género, especie u organismo específico que el organismo del que se deriva el sistema de PKS de AGPI, o puede catalizar la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga producidos por el sistema de PKS de AGPI en acil-CoA. En otra realización, el organismo se ha modificado genéticamente para expresar una proteína que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG. En aún otra realización, el organismo se ha modificado genéticamente para expresar tanto la ACoAS descrita anteriormente como una proteína que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG. En una realización, si el sistema de PKS de AGPI es endógeno para el huésped, el organismo puede modificarse genéticamente para expresar una proteína auxiliar heteróloga tal como se describió anteriormente que mejora o potencia la producción y/o acumulación de AGPI (u otro producto bioactivo del sistema de PKS de AGPI) en el organismo huésped, y/o el organismo puede modificarse genéticamente para aumentar, optimizar o potenciar la expresión y/o actividad biológica de una proteína auxiliar de este tipo que se expresa de manera endógena por el organismo (por ejemplo, para mejorar la expresión o actividad de una ACoAS endógena que funciona con el sistema de PKS de AGPI endógeno en el huésped). En una realización, el organismo se modifica genéticamente mediante cualquier método, incluyendo selección natural y mutación, mutación dirigida o mutación al azar y selección, etc., para potenciar la capacidad de la PKS de AGPI para competir por sustrato dentro del huésped (por ejemplo, mediante inhibición de rutas de FAS y otras rutas competidoras descritas en el presente documento). En una realización, se inhibe la ruta de FAS en el organismo. En una realización, se inhibe KASII y/o KASIII en el organismo. Estas realizaciones de la invención se describen en detalle anteriormente. Los organismos modificados genéticamente preferidos incluyen microorganismos modificados genéticamente y plantas modificadas genéticamente.

El organismo puede expresar de manera endógena un sistema de PKS de AGPI, aunque la presente invención es especialmente útil para potenciar la producción y/o acumulación de AGPI en organismos que se modifican genéticamente para expresar el sistema de PKS de AGPI (huéspedes heterólogos). El sistema de PKS de AGPI expresado por el organismo puede incluir cualquier sistema de PKS de AGPI, por ejemplo, sistemas de PKS de AGPI que se derivan totalmente de un organismo particular (por ejemplo, un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium*), así como sistemas de PKS de AGPI que se producen "mezclando y haciendo coincidir" secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas y/o dominios de sistemas de PKS de AGPI diferentes (por ejemplo, mezclando proteínas y/o dominios de PKS de AGPI de *Schizochytrium* con proteínas y/o dominios de PKS de AGPI de, por ejemplo, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Shewanella*, *Moritella* y/o *Photobacterium*, etc.) y/o de sistemas de PKS distintos de AGPI diferentes (por ejemplo, sistemas de PKS de tipo I modular, tipo I iterativo, tipo II o tipo III), en los que las proteínas y/o los dominios de diferentes organismos se combinan para formar un sistema de PKS de AGPI completo, funcional. Se describen en detalle sistemas de PKS de AGPI, incluyendo la combinación de genes o proteínas de PKS de AGPI de diferentes organismos, en la patente estadounidense n.º 6.140.486; la patente estadounidense 6.566.583; Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001); la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995; y la publicación PCT n.º WO 2006/135866; citadas anteriormente). También se dan a conocer genes y proteínas de PKS de AGPI en: la publicación de patente PCT n.º WO 05/097982; y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050014231.

Por consiguiente, se abarcan por la presente invención métodos para modificar genéticamente organismos: modificando genéticamente al menos una secuencia de ácido nucleico en el organismo que codifica para al menos un dominio funcional o proteína (o un fragmento biológicamente activo u homólogo del mismo) de un sistema de PKS de AGPI, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier sistema de PKS de AGPI descrito específicamente en el presente documento, y/o expresando al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para tal dominio o proteína. Además, los métodos incluyen modificar genéticamente los organismos modificando genéticamente al menos una secuencia de ácido nucleico en el organismo que codifica para una ACoAS y/o una proteína que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG al menos un dominio funcional o proteína, y/o expresando al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para tal(es) proteína(s). Los métodos pueden incluir además modificar genéticamente el organismo para inhibir una ruta que compite con la PKS de AGPI por el sustrato, tal como el sistema de FAS, incluyendo, pero sin limitarse a, la inhibición de KASII o KASIII en el organismo. En una realización, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico introducidas de manera exógena puede optimizarse para el uso de codones o la expresión mejorada en el huésped. En una realización, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico introducidas puede dirigirse a uno o más orgánulos en el organismo. Diversas realizaciones de tales secuencias, métodos para modificar genéticamente un organismo, modificaciones específicas

y combinaciones de los mismos se han descrito en detalle anteriormente y se abarcan en el presente documento. Normalmente, el método se usa para producir un organismo modificado genéticamente particular que produce una molécula o moléculas bioactivas particulares. Preferiblemente el organismo modificado genéticamente es un microorganismo modificado genéticamente o una planta modificada genéticamente.

5 Preferiblemente, un organismo modificado genéticamente de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados incluyendo, pero sin limitarse a, EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6), ALA (C18:3, n-3) y/o SDA (C18:4, n-3)), y más preferiblemente, uno o más AGPI de cadena más larga, incluyendo, pero sin limitarse a, EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3) o
10 DTA (C22:4, n-6), o cualquier combinación de los mismos. En una realización particularmente preferida, una planta modificada genéticamente 74 de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados incluyendo, pero sin limitarse a, EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3) y/o DPA (C22:5, n-6 o n-3), o cualquier combinación de los mismos.

15 Según la presente invención, un organismo modificado genéticamente incluye un organismo que se ha modificado usando tecnología recombinante o mediante técnicas de mutagénesis y selección clásicas. Tal como se usa en el presente documento, modificaciones genéticas que dan como resultado una disminución en la expresión génica, en la función del gen, o en la función del producto génico (es decir, la proteína codificada por el gen) pueden denominarse inactivación (completa o parcial), delección, interrupción, bloqueo o regulación por disminución de un gen. Por ejemplo, una modificación genética en un gen que da como resultado una disminución en la función de la
20 proteína codificada por tal gen, puede ser el resultado de una delección completa del gen (es decir, el gen no existe, y por tanto la proteína no existe), una mutación en el gen que da como resultado una traducción incompleta de la proteína o ausencia de la misma (por ejemplo, la proteína no se expresa), o una mutación en el gen que disminuye o suprime la función natural de la proteína (por ejemplo, se expresa una proteína que tiene una actividad o acción enzimática disminuida o ausencia de la misma). Modificaciones genéticas que dan como resultado un aumento en la
25 expresión o función génica pueden denominarse amplificación, sobreproducción, sobreexpresión, activación, potenciación, adición o regulación por incremento de un gen.

La modificación genética de un organismo según la presente invención afecta preferiblemente a la actividad del sistema de PKS de AGPI expresado por el organismo, ya sea el sistema de PKS de AGPI endógeno y modificado
30 genéticamente, endógeno con la introducción de moléculas de ácido nucleico recombinantes en el organismo (con la opción de modificación del sistema endógeno o no) o proporcionado completamente mediante tecnología recombinante. Alterar el perfil de producción de AGPI de un sistema de PKS de AGPI u organismo que expresa tal sistema incluye provocar cualquier cambio detectable o medible en la producción de uno cualquiera o más AGPI (u otra molécula bioactiva producida por el sistema de PKS de AGPI) por el organismo huésped en comparación con
35 en ausencia de la modificación genética (es decir, en comparación con el organismo no modificado, de tipo natural o el organismo que no está modificado al menos con respecto a la síntesis de AGPI, es decir, el organismo podría tener otras modificaciones no relacionadas con la síntesis de AGPI). Afectar a la actividad de un sistema de PKS de AGPI incluye cualquier modificación genética que provoque cualquier cambio o modificación detectable o medible en el sistema de PKS de AGPI expresado por el organismo en comparación con en ausencia de la modificación
40 genética. Un cambio o una modificación detectable en el sistema de PKS de AGPI puede incluir, pero no se limita a: un cambio o una modificación (introducción de, aumento o disminución) de la expresión y/o actividad biológica de uno cualquiera o más de los dominios en un sistema de PKS de AGPI modificado en comparación con el sistema de PKS de AGPI endógeno en ausencia de modificación genética; la introducción de actividad de sistema de PKS de AGPI (es decir, el organismo no contenía un sistema de PKS o un sistema de PKS de AGPI antes de la modificación
45 genética) en un organismo de manera que el organismo tiene ahora una actividad de sistema de PKS de AGPI medible/detectable.

Debe indicarse que la referencia a aumentar la actividad de un dominio funcional o proteína en un sistema de PKS de AGPI, incluyendo en una proteína auxiliar a un sistema de PKS de AGPI, se refiere a cualquier modificación genética en el organismo que contenga el dominio o la proteína (o en el que el dominio o la proteína va a introducirse) que dé como resultado un aumento de la funcionalidad del dominio o la proteína o el sistema y puede
50 incluir actividad superior del dominio o la proteína o el sistema (por ejemplo, actividad específica o actividad enzimática *in vivo*), inhibición o degradación reducida del dominio o la proteína o el sistema, y sobreexpresión del dominio o la proteína o el sistema. Por ejemplo, el número de copias del gen puede aumentarse, los niveles de expresión pueden aumentarse mediante el uso de un promotor que proporciona niveles de expresión superiores a los del promotor nativo, o puede alterarse un gen mediante ingeniería genética o mutagénesis clásica para aumentar la actividad del dominio o la proteína codificada por el gen.

De manera similar, la referencia a disminuir la actividad de un dominio funcional o proteína en un sistema de PKS de AGPI, incluyendo en una proteína auxiliar a un sistema de PKS de AGPI, se refiere a cualquier modificación genética en el organismo que contiene tal dominio o proteína (o en el que el dominio o la proteína va a introducirse) que da como resultado una disminución de la funcionalidad del dominio o la proteína e incluye actividad disminuida del dominio o la proteína, inhibición o degradación aumentada del dominio o la proteína y una reducción o eliminación de la expresión del dominio o la proteína. Por ejemplo, la acción del dominio o la proteína de la presente invención
60 puede disminuirse bloqueando o reduciendo la producción del dominio o la proteína, "desactivando" el gen o la parte del mismo que codifica para el dominio o la proteína, reduciendo la actividad del dominio o la proteína, o inhibiendo
65

la actividad del dominio o la proteína. El bloqueo o la reducción de la producción de un dominio o una proteína puede incluir colocar el gen que codifica para el dominio o la proteína bajo el control de un promotor que requiere la presencia de un compuesto inductor en el medio de crecimiento. Estableciendo las condiciones de manera que el inductor se agote del medio, podría inactivarse la expresión del gen que codifica para el dominio o la proteína (y por tanto, de la síntesis de proteínas). Los presentes inventores demuestran la capacidad para delecionar (desactivar) genes seleccionados como diana en un microorganismo traustocquitridio en la sección de ejemplos. El bloqueo o la reducción de la actividad de un dominio o una proteína también podría incluir el uso de un enfoque de tecnología de supresión similar al descrito en la patente estadounidense n.º 4.743.546. Para usar este enfoque, se clona el gen que codifica para la proteína de interés entre secuencias genéticas específicas que permiten la supresión específica, controlada del gen del genoma. La supresión podría promoverse mediante, por ejemplo, un desplazamiento en la temperatura de cultivo del cultivo, como en la patente estadounidense n.º 4.743.546, o mediante alguna otra señal física o nutricional.

Microorganismos modificados genéticamente

Tal como se usa en el presente documento, un microorganismo modificado genéticamente puede incluir una bacteria, un protista, microalgas, algas, un hongo u otro microbio modificado genéticamente. Un microorganismo modificado genéticamente de este tipo tiene un genoma que está modificado (es decir, mutado o cambiado) con respecto a su forma normal (es decir, de tipo natural o que se produce de manera natural) de manera que se logra el resultado deseado (es decir, actividad de PKS de AGPI aumentada o modificada y/o producción y acumulación de un producto deseado usando el sistema de PKS de AGPI). La modificación genética de un microorganismo puede lograrse usando técnicas clásicas de desarrollo de cepas y/o genética molecular. Tales técnicas se conocen en la técnica y se dan a conocer generalmente para microorganismos, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press. Un microorganismo modificado genéticamente puede incluir un microorganismo en el que se han insertado, delecionado o modificado moléculas de ácido nucleico (es decir, mutado; por ejemplo, mediante inserción, delección, sustitución y/o inversión de nucleótidos), de tal manera que tales modificaciones proporcionan el efecto deseado dentro del microorganismo.

Los ejemplos de microorganismos huésped adecuados para modificación genética incluyen, pero no se limitan a, levaduras incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* u otras levaduras tales como *Candida*, *Kluyveromyces*, u otros hongos, por ejemplo, hongos filamentosos tales como *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, etc. También pueden usarse células bacterianas como huéspedes. Éstas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, que puede ser útil en procesos de fermentación. Alternativamente, y sólo a modo de ejemplo, puede usarse como huésped un huésped tal como una especie de *Lactobacillus* o especie de *Bacillus*.

Otros huéspedes para su uso en la presente invención incluyen microorganismos de un género incluyendo, pero sin limitarse a: *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, *Elina* y *Schizochytrium* dentro de Thraustochytriaceae, y *Labyrinthula*, *Labyrinthuloides* y *Labyrinthomyxa* dentro de Labyrinthulaceae. Las especies preferidas dentro de estos géneros incluyen, pero no se limitan a: cualquier especie descrita a continuación. Las cepas particularmente preferidas de Thraustochytriales incluyen, pero no se limitan a: *Schizochytrium sp.* (S31) (ATCC 20888); *Schizochytrium sp.* (S8) (ATCC 20889); *Schizochytrium sp.* (LC-RM) (ATCC 18915); *Schizochytrium sp.* (SR21); *Schizochytrium sp.* N230D, *Schizochytrium aggregatum* (Goldstein y Belsky) (ATCC 28209); *Schizochytrium limacinum* (Honda y Yokochi) (IFO 32693); *Thraustochytrium sp.* (23B) (ATCC 20891); *Thraustochytrium striatum* (Schneider) (ATCC 24473); *Thraustochytrium aureum* (Goldstein) (ATCC 34304); *Thraustochytrium roseum* (Goldstein) (ATCC 28210); y *Japonochytrium sp.* (L1) (ATCC 28207).

Según la presente invención, el término "traustocquitridio" se refiere a cualquier miembro del orden Thraustochytriales, que incluye la familia Thraustochytriaceae, y el término "labyrinthulido" se refiere a cualquier miembro del orden Labyrinthulales, que incluye la familia Labyrinthulaceae. En algún momento se consideró que los miembros de la familia Labyrinthulaceae eran miembros del orden Thraustochytriales, pero en revisiones más recientes de la taxonomía de tales organismos, se considera ahora que la familia es un miembro del orden Labyrinthulales, y se considera que tanto Labyrinthulales como Thraustochytriales son miembros del filo Labyrinthulomycota. Los desarrollos han dado como resultado una revisión frecuente de la taxonomía de los traustocquitridios y labyrinthulidos. Sin embargo, los teóricos de la taxonomía colocan ahora generalmente a ambos de estos grupos de microorganismos con las algas o protistas similares a las algas dentro del linaje de Stramenopila. La colocación taxonómica actual de los traustocquitridios y labyrinthulidos puede resumirse tal como sigue:

Reino: Stramenopila (Chromista)

Filo: Labyrinthulomycota

Clase: Labyrinthulomycetes

Orden: Labyrinthulales

Familia: Labyrinthulaceae

Orden: Thraustochytriales

Familia: Thraustochytriaceae

5

Sin embargo, debido a las incertidumbres taxonómicas que quedan, lo mejor para los fines de la presente invención sería considerar las cepas descritas en la presente invención como traustochytridios incluyendo los siguientes organismos: Orden: Thraustochytriales; Familia: Thraustochytriaceae; Géneros: *Thraustochytrium* (especies: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *striatum*), *Ulkenia* (especies: sp., *amoeboidea*, *kerquelenensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrrops*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Schizochytrium* (especies: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Japonochytrium* (especie: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (especies: sp., *haliotidis*, *kerquelenensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Althornia* (especie: sp., *crouchii*) o *Elina* (especies: sp., *marisalba*, *sinorifica*). Debe indicarse que la descripción original del género *Ulkenia* no se publicó en una revista revisada por expertos de modo que siguen existiendo algunas cuestiones en cuanto a la validez de este género y las especies colocadas dentro del mismo. Para los fines de esta invención, se considerará que las especies descritas dentro de *Ulkenia* son miembros del género *Thraustochytrium*.

10

15

20

Las cepas descritas en la presente invención como laberintúlidos incluyen los siguientes organismos: Orden: Labyrinthulales, Familia: Labyrinthulaceae, Géneros: *Labyrinthula* (especies: sp., *algeriensis*, *coenocystis*, *chattonii*, *macrocystis*, *macrocystis atlantica*, *macrocystis macrocystis*, *marina*, *minuta*, *roscoffensis*, *valkanovii*, *vitellina*, *vitellina pacifica*, *vitellina vitellina*, *zopfii*), *Labyrinthuloides* (especies: sp., *haliotidis*, *yorkensis*), *Labyrinthomyxa* (especie: sp., *maria*), *Diplophrys* (especie: sp., *archeri*), *Pyrrhosorus* (especie: sp., *marinus*), *Sorodiplophrys* (especie: sp., *stercorea*) o *Chlamydomyxa* (especies: sp., *labyrinthuloides*, *montana*) (aunque no hay actualmente un consenso sobre la colocación taxonómica exacta de *Pyrrhosorus*, *Sorodiplophrys* o *Chlamydomyxa*).

25

30

35

40

En una realización de la presente invención, el sistema de PKS de AGPI endógeno y/o las proteínas auxiliares de PKS de AGPI endógenas (por ejemplo, ACoAS) de un microorganismo se modifica genéticamente mediante, por ejemplo, técnicas de mutagénesis y selección clásicas y/o técnicas de genética molecular, incluyendo técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética pueden incluir, por ejemplo, el uso de un vector recombinante de direccionamiento para delecionar una parte de un gen endógeno o para reemplazar una parte de un gen endógeno por una secuencia heteróloga. Los ejemplos de secuencias heterólogas que podrían introducirse en un genoma huésped incluyen secuencias que codifican para al menos un dominio o una proteína de PKS de AGPI funcional de otro sistema de PKS o incluso un sistema de PKS de AGPI entero (por ejemplo, todos los genes asociados con el sistema de PKS de AGPI). Una secuencia heteróloga también puede incluir una secuencia que codifica para un dominio funcional modificado (un homólogo) de un dominio natural de un sistema de PKS de AGPI. Otras secuencias heterólogas que pueden introducirse en el genoma huésped incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas que afectan a la actividad del sistema de PKS de AGPI endógeno, tal como las proteínas auxiliares descritas en el presente documento. Por ejemplo, podría introducirse en el genoma huésped una molécula de ácido nucleico que codifica para una ACoAS, y particularmente, una ACoAS que potencia la producción y/o acumulación de AGPI en el huésped en comparación con la ACoAS endógena que funciona con el sistema de PKS de AGPI.

45

Plantas modificadas genéticamente

50

Otra realización de la presente invención se refiere a una planta modificada genéticamente, en la que la planta se ha modificado genéticamente para expresar de manera recombinante un sistema de PKS de AGPI, incluyendo una PPTasa, tal como se describe en el presente documento, y en la que la planta se ha modificado genéticamente de manera adicional para expresar una proteína auxiliar tal como se describe en el presente documento para la mejora de la producción y/o acumulación de AGPI (u otros productos bioactivos del sistema de PKS de AGPI) por el huésped y/o para inhibir rutas que compiten con el sistema de PKS de AGPI (por ejemplo, inhibición del sistema de FAS). Preferiblemente, tal proteína auxiliar es una ACoAS y/o una proteína que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG (por ejemplo, un GPAT, LFAAT o DAGAT).

55

60

65

Tal como se usa en el presente documento, una planta modificada genéticamente puede incluir cualquier planta modificada genéticamente incluyendo plantas superiores y, particularmente, cualquier planta consumible o planta útil para producir una molécula bioactiva deseada (por ejemplo, AGPI) de la presente invención. "Partes de plantas", tal como se usa en el presente documento, incluyen cualquier parte de una planta, incluyendo, pero sin limitarse a, semillas (semillas maduras y semillas inmaduras), polen, embriones, flores, frutos, brotes, hojas, raíces, tallos, explantes, etc. Una planta modificada genéticamente tiene un genoma que está modificado (es decir, mutado o cambiado) con respecto a su forma normal (es decir, de tipo natural o que se produce de manera natural) de manera que se logra el resultado deseado (por ejemplo, actividad PKS de AGPI aumentada o modificada y/o producción y/o acumulación de un producto deseado usando el sistema de PKS de AGPI). La modificación genética de una planta puede lograrse usando técnicas clásicas de desarrollo de cepas y/o genética molecular. En la técnica se conocen métodos para producir una planta transgénica, en los que se incorpora en el genoma de la planta una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica para una secuencia de aminoácidos deseada. Una planta preferida para

modificarse genéticamente según la presente invención es preferiblemente una planta adecuada para su consumo por animales, incluyendo seres humanos.

5 Las plantas preferidas para modificarse genéticamente según la presente invención (es decir, células huésped de plantas) incluyen, pero no se limitan a, cualquier planta superior, incluyendo plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, y particularmente plantas consumibles, incluyendo plantas cultivadas y especialmente plantas usadas por sus aceites. Tales plantas pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo: canola, sojas, colza, linaza, maíz, cártamos, girasoles y tabaco. Por tanto, puede seleccionarse cualquier especie de planta o célula de planta. Las células particulares usadas en el presente documento, y las plantas que se hacen crecer o se derivan a partir de 10 las mismas, incluyen, pero no se limitan a, células que pueden obtenerse de canola (*Brassica rapa* L.); soja (*Glycine max*); colza (*Brassica spp.*); linaza/lino (*Linum usitatissimum*); maíz (*Zea mays*); cártamo (*Carthamus tinctorius*); girasol (*Helianthus annuus*); tabaco (*Nicotiana tabacum*); *Arabidopsis thaliana*, nuez de Brasil (*Betholettia excelsa*); ricino (*Ricinus communis*); coco (*Cocos nucifera*); cilantro (*Coriandrum sativum*); algodón (*Gossypium spp.*); cacahuete (*Arachis hypogaea*); jojoba (*Simmondsia chinensis*); mostaza (*Brassica spp.* y *Sinapis alba*); palma de aceite (*Elaeis guineensis*); olivo (*Olea europaea*); arroz (*Oryza sativa*); calabacín (*Cucurbita maxima*); cebada (*Hordeum vulgare*); trigo (*Triticum aestivum*) y lenteja de agua (*Lemnaceae sp.*). Debe observarse que según el presente documento el contexto genético dentro de una especie de planta puede variar.

20 Líneas de plantas de estas plantas, optimizadas para un rasgo particularmente deseable, por ejemplo resistencia a enfermedades, facilidad de transformación de plantas, perfil o contenido en aceite, etc., pueden producirse, seleccionarse o identificarse de acuerdo con lo mismo. Pueden seleccionarse líneas de plantas preferidas a través de cría de plantas, o a través de métodos tales como labranza y cría asistida por marcador. Debe indicarse que son particularmente útiles líneas de plantas que presentan actividad modulada con respecto a cualquiera de las proteínas auxiliares, inhibición dirigida de rutas y/o el sistema de PKS de AGPI (AGPI sintasa) mencionados en el 25 presente documento.

En una realización adicional, pueden usarse cultivos de células vegetales de acuerdo con lo mismo. En tales realizaciones, no se hacen crecer células vegetales para dar plantas diferenciadas ni se cultivan usando prácticas agrícolas habituales, sino que en su lugar se hacen crecer y se mantienen en un medio líquido.

30 Otras plantas preferidas incluyen aquellas plantas que se sabe que producen compuestos usados como agentes farmacéuticos, agentes aromatizantes, agentes nutracéuticos, componentes alimenticios funcionales o agentes cosméticamente activos o plantas que se modifican por ingeniería genética para producir estos compuestos/agentes.

35 Tal como se comentó anteriormente, la sintasa PKS de AGPI de la presente invención no utiliza los productos de ácidos grasos de sistemas de FAS. En vez de eso, produce el producto de AGPI final (el producto de AGPI primario) a partir de la misma molécula precursora pequeña que se utiliza por FAS y elongasas (malonil-CoA). Por tanto, no se liberan productos intermedios en el ciclo de síntesis en ninguna cantidad significativa, y el producto de AGPI (también denominado en el presente documento producto de AGPI primario) se transfiere eficientemente a 40 fracciones de fosfolípidos (PL) y triacilglicerol (TAG) de los lípidos. En efecto, un sistema de PKS de AGPI puede producir dos productos de AGPI objetivo o primarios (por ejemplo, el sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* produce tanto DHA como DPAn-6 como productos primarios), pero DPA no es un producto intermedio en la ruta para producir DHA. En vez de eso, cada uno es un producto separado del mismo sistema de PKS de AGPI. Por tanto, los genes de PKS de AGPI son un medio excelente de producción de aceites que contienen AGPI, y 45 particularmente, AGPI de cadena larga (AGPICL) en un huésped heterólogo, tal como una planta, en el que los aceites están sustancialmente libres (definido a continuación) de los productos intermedios y productos secundarios que contaminan los aceites producidos por la ruta de AGPI "habitual" (también definido a continuación).

50 Por tanto, un objeto de la presente invención es producir, mediante manipulación genética de plantas tal como se describe en el presente documento, ácidos grasos poliinsaturados de longitud de cadena deseada y con números deseados de dobles enlaces y, por extensión, semillas oleaginosas y aceites obtenidos a partir de tales plantas (por ejemplo, obtenidos a partir de las semillas oleaginosas de tales plantas) que comprenden estos AGPI. Los ejemplos de los AGPI que puede producirse por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, DHA (ácido docosahexaenoico (C22:6, n-3)), ARA (ácido eicosatetraenoico o ácido araquidónico (C20:4, n-6)), DPA (ácido docosapentaenoico (C22:5, n-6 o n-3)) y EPA (ácido eicosapentaenoico (C20:5, n-3)) y cualquier combinación de los 55 mismos. La presente invención permite la producción de lípidos comercialmente valiosos enriquecidos en uno o más AGPI deseados (objetivos o primarios) mediante el desarrollo de los presentes inventores de plantas modificadas genéticamente mediante el uso del sistema de tipo policétido sintasa de la presente invención que produce AGPI.

60 Según la presente invención, la referencia a un "AGPI primario", "AGPI objetivo", "AGPI pretendido" o "AGPI deseado" se refiere al AGPI o a los AGPI particulares que son el producto pretendido u objetivo de la ruta enzimática que se usa para producir el/los AGPI. Por ejemplo, cuando se usan elongasas y desaturasas para modificar productos de los sistemas de FAS, pueden seleccionarse combinaciones particulares de elongasas y desaturasas que, cuando se usan juntas, producirán un AGPI objetivo o deseado (por ejemplo, DHA o EPA). Tal como se 65 comentó anteriormente, tal AGPI objetivo o deseado producido por la ruta habitual puede no ser realmente un AGPI "primario" en cuanto a la cantidad de AGPI como porcentaje de ácidos grasos totales producidos por el sistema,

debido a la formación de productos intermedios y secundarios que pueden representar realmente la mayoría de los productos producidos por el sistema. Sin embargo, puede usarse el término “AGPI primario” incluso en ese caso para hacer referencia al producto de AGPI objetivo o pretendido producido por las elongasas o desaturasas usadas en el sistema.

5

Cuando se usa un sistema de PKS de AGPI tal como se prefiere en la presente invención, un sistema de PKS de AGPI dado derivado de un organismo particular producirá AGPI particular(es), de manera que la selección de un sistema de PKS de AGPI de un organismo particular dará como resultado la producción de AGPI objetivo o primarios especificados. Por ejemplo, el uso de un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* dará como resultado la producción de DHA y DPAn-6 como AGPI objetivo o primarios. Por otro lado, el uso de un sistema de PKS de AGPI de diversas especies de *Shewanella* dará como resultado la producción de EPA como AGPI objetivo o primario. Se observa que la razón de los AGPI objetivo o primarios puede diferir dependiendo de la selección del sistema de PKS de AGPI particular y de cómo responde ese sistema a las condiciones específicas en las que se expresa. Por ejemplo, el uso de un sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium* 23B (ATCC n.º 20892) también dará como resultado la producción de DHA y DPAn-6 como AGPI objetivo o primarios; sin embargo, en el caso de *Thraustochytrium* 23B, la razón de DHA con respecto a DPAn-6 es de aproximadamente 10:1 (y puede oscilar entre aproximadamente 8:1 y aproximadamente 40:1), mientras que en *Schizochytrium*, normalmente la razón es de aproximadamente 2,5:1. Por tanto, el uso de un sistema o proteínas o dominios PKS de AGPI de *Thraustochytrium* puede alterar la razón de AGPI producidos por un organismo en comparación con *Schizochytrium* incluso aunque los AGPI objetivo sean los mismos. Además, tal como se comenta a continuación, también puede modificarse un sistema de PKS de AGPI dado entremezclando proteínas y dominios de diferentes sistemas de PKS de AGPI o sistemas de PKS de AGPI y PKS, o puede modificarse un dominio o una proteína de un sistema de PKS de AGPI dado para cambiar las razones y/o el producto de AGPI objetivo.

25 Según la presente invención, la referencia a “productos intermedios” o “productos secundarios” de un sistema enzimático que produce AGPI se refiere a cualquier producto, y particularmente, producto de ácidos grasos, que se produce por el sistema enzimático como resultado de la producción del/de los AGPI objetivo o primario(s) del sistema, pero que no son el/los AGPI primario(s) u objetivo. En una realización, los productos intermedios y secundarios pueden incluir ácidos grasos no objetivo que se producen de manera natural por la planta de tipo natural o por la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada, pero ahora se clasifican como productos intermedios o secundarios porque se producen en niveles superiores como resultado de la modificación genética, en comparación con los niveles producidos por la planta de tipo natural o por la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada. Los productos intermedios y secundarios son particularmente significativos en la ruta habitual para la síntesis de AGPI y son sustancialmente menos significativos en la ruta de PKS de AGPI, tal como se comentó anteriormente. Se observa que un AGPI primario u objetivo de un sistema enzimático puede ser un producto intermedio de un sistema enzimático diferente en el que el producto primario u objetivo es un AGPI diferente, y esto es particularmente cierto para productos de la ruta habitual de producción de AGPI, ya que el sistema de PKS de AGPI evita sustancialmente la producción de productos intermedios. Por ejemplo, cuando se usa la ruta habitual para producir EPA, se producen ácidos grasos tales como GLA, DGLA y SDA como productos intermedios en cantidades significativas (por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0172682 ilustra este punto). De manera similar, y también ilustrado por la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0172682, cuando se usa la ruta habitual para producir DHA, además de los ácidos grasos mencionados anteriormente, se producen ETA y EPA (de manera notable, el AGPI objetivo en el primer ejemplo anterior) en cantidades significativas y de hecho, pueden estar presentes en cantidades significativamente superiores con respecto al producto de ácidos grasos totales al propio AGPI objetivo. Este último punto también se muestra en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0172682, en la que una planta que se modificó por ingeniería genética para producir DHA por la ruta habitual produce más EPA como porcentaje de ácidos grasos totales que el DHA objetivo.

50 Para producir rendimientos significativamente altos de uno o más ácidos grasos poliinsaturados deseados, puede modificarse genéticamente una planta para introducir un sistema de PKS de AGPI en la planta. No se sabe que las plantas contengan de manera endógena un sistema de PKS de AGPI, y por tanto, los sistemas de PKS de AGPI de la presente invención representan una oportunidad para producir plantas con capacidades de producción de ácidos grasos únicas. Una realización particularmente preferida de la presente invención es modificar genéticamente plantas para producir uno o más AGPI en la misma planta, incluyendo, EPA, DHA, DPA (n3 o n6), ARA, GLA, SDA y otros, incluyendo cualquier combinación de los mismos. La presente invención ofrece la capacidad para crear uno cualquiera de varios “aceites de diseño” en diversas razones y formas. Además, la divulgación de los genes de PKS de AGPI de los organismos marinos particulares descritos en el presente documento ofrece la oportunidad para extender más fácilmente el intervalo de producción de AGPI y producir satisfactoriamente tales AGPI dentro de intervalos de temperatura usados para hacer crecer la mayoría de las plantas cultivadas.

65 Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a una planta o parte de una planta modificada genéticamente (por ejemplo, en la que la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI descrito en el presente documento), que incluye el complejo enzimático de PKS de AGPI central y una PPTasa, tal como se describe en el presente documento, en la que la planta se ha modificado genéticamente para expresar una proteína auxiliar tal como se describe en el presente documento para la mejora de la producción y/o

5 acumulación de AGPI (u otros productos bioactivos del sistema de PKS de AGPI) por el huésped y/o en la que la planta se ha modificado genéticamente para inhibir rutas que compiten con el sistema de PKS de AGPI (por ejemplo, inhibición del sistema de FAS) tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, tal proteína auxiliar es una ACoAS y/o una proteína que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG (por ejemplo, una GPAT, LFAAT o DAGAT). De ese modo la planta produce AGPI.

10 Preferiblemente, tal modificación genética adicional es cualquier modificación (que se produce de manera natural, seleccionada o sintetizada) que aumente el flujo a través de la ruta de AGPI sintasa reduciendo la competición por la(s) reserva(s) de malonil-CoA. Hay muchos modos posibles para lograr una capacidad potenciada para competir por este sustrato. Estos incluyen, pero no se limitan a, 1) inhibición de rutas competidoras, incluyendo inhibición de cualquier elemento en la ruta de FAS, por ejemplo, reduciendo los niveles de expresión de enzimas o subunidades implicadas en esas rutas (por ejemplo, mediante el uso de ARN antisentido, iARN, cosupresión o mutaciones), 2) expresión de la AGPI sintasa en huéspedes heterólogos en los que se han reducido o bloqueado rutas competidoras (por ejemplo, en canola en la que la capacidad para elongar ácidos grasos en el citoplasma se ha bloqueado) y/o 3) aumentando la reserva de malonil-CoA (por ejemplo, mediante expresión de acetil-CoA carboxilasa). En una realización, se inhiben KASII y/o KASIII en la planta (por ejemplo, mediante iARN o mediante una molécula antisentido).

20 Tal como se comentó anteriormente, la planta modificada genéticamente útil en la presente invención se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI. El sistema de PKS de AGPI puede incluir cualquier sistema de PKS de AGPI, tal como cualquier sistema de PKS de AGPI descrito en, por ejemplo, la patente estadounidense 6.566.583; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995; y la publicación PCT n.º WO 2006/135866. El sistema de PKS de AGPI puede elegirse de, pero no se limita a, cualquiera de los sistemas de PKS de AGPI específicos identificados y caracterizados en estas patentes y publicaciones de patente, tales como los sistemas de PKS de AGPI de *Schizochytrium sp.*, n.º de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) 20888, y cepas mutantes derivadas de la misma (por ejemplo, la cepa N230D); *Thraustochytrium* 23B, n.º de la ATCC 20892, y cepas mutantes derivadas de la misma; *Shewanella olleyana*, número de cepa de la Colección australiana de microorganismos antárticos (*Australian Collection of Antarctic Microorganisms*) (ACAM) 644, y cepas mutantes derivadas del mismo; o *Shewanella japonica*, número de cepa de la ATCC BAA-316, y cepas mutantes derivadas de la misma.

35 En una realización, el sistema de PKS de AGPI comprende dominios seleccionados de cualquiera de los sistemas de PKS de AGPI anteriores, en el que los dominios se combinan (se mezclan y se hacen coincidir) para formar un sistema de PKS de AGPI completo que cumple los requisitos mínimos tal como se comentó anteriormente. La planta también puede modificarse adicionalmente con al menos un dominio o fragmento biológicamente activo del mismo de otro sistema de PKS, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas de PKS de tipo I (iterativo o modular), sistemas de PKS de tipo II y/o sistemas de PKS de tipo III, que pueden sustituir a un dominio en un sistema de PKS de AGPI. Finalmente, cualquiera de los dominios de un sistema de PKS de AGPI puede modificarse con respecto a su estructura natural para modificar o potenciar la función de ese dominio en el sistema de PKS de AGPI (por ejemplo, para modificar los tipos de AGPI o las razones de los mismos producidos por el sistema). Tal mezclado de dominios para producir proteínas PKS de AGPI quiméricas se describe en las patentes y publicaciones de patente a las que se hizo referencia anteriormente.

45 Preferiblemente, una planta que tiene cualquiera de las características identificadas anteriormente es una planta que se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI (AGPI sintasa) tal como se describe en detalle en el presente documento (es decir, el sistema de PKS de AGPI es el sistema enzimático que produce el/los AGPI objetivo en la planta). En una realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por proteínas/dominios de PKS de AGPI de un traustochytridio, incluyendo, pero sin limitarse a, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, *Althornia* o *Elina*. En una realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por proteínas/dominios de PKS de AGPI de un laberintúlido. En otra realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por proteínas/dominios de PKS de AGPI de una bacteria marina, incluyendo, pero sin limitarse a, *Shewanella japonica* o *Shewanella olleyana*. En una realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por Orf A, B y C de *Schizochytrium* (incluyendo homólogos o versiones sintéticas de los mismos), y una PPTasa (por ejemplo, HetI) tal como se describió anteriormente (por ejemplo, véanse SEQ ID NO: 1-32 y SEQ ID NO: 33, y la discusión de sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* anterior). En otra realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por Orf A, B y C de *Thraustochytrium* (incluyendo homólogos o versiones sintéticas de los mismos), y una PPTasa (por ejemplo, HetI) tal como se describió anteriormente (por ejemplo, véanse SEQ ID NO: 38-68 y SEQ ID NO: 33, y la discusión de sistema de PKS de AGPI de *Thraustochytrium* anterior; véase también la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050014231). En otra realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto por otros Orf A, B y C de traustochytridio (incluyendo homólogos o versiones sintéticas de los mismos), y una PPTasa (por ejemplo, HetI) (por ejemplo, véase la publicación de patente PCT n.º WO 05/097982). En otra realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar un sistema de PKS de AGPI compuesto

por Orf de PKS de AGPI de bacterias marinas tales como *Shewanella* (incluyendo homólogos o versiones sintéticas de los mismos), y una PPTasa (por ejemplo, la PPTasa de *Shewanella* endógena) tal como se describió anteriormente (por ejemplo, véanse SEQ ID NO: 1-6 para *Shewanella japonica*, SEQ ID NO: 7-12 para *Shewanella olleyana*). En otra realización, la planta se ha modificado genéticamente para expresar cualquier combinación de dominios y proteínas de tales sistemas de PKS de AGPI (por ejemplo, un sistema de PKS de AGPI quimérico).

Finalmente, tal como se comentó anteriormente, la modificación genética de la planta puede incluir la introducción de una o más proteínas auxiliares que actuarán con el complejo enzimático de PKS de AGPI central para permitir, facilitar o potenciar la producción de AGPI por la planta, y/o una modificación genética que da como resultado un flujo potenciado de sustrato de malonil CoA a través del sistema de PKS de AGPI, tal como mediante cualquier inhibición del sistema de FAS descrito en el presente documento, o el uso de otras estrategias para lograr el mismo resultado que se describe en el presente documento. La modificación genética de la planta también puede incluir la optimización de genes para un uso de codones por el huésped preferido, así como el direccionamiento de las enzimas AGPI sintasa a orgánulos particulares (por ejemplo, el plástido).

Preferiblemente, la planta es una planta de semillas oleaginosas, en la que las semillas oleaginosas, y/o el aceite en las semillas oleaginosas, contienen AGPI producidos por el sistema de PKS de AGPI. Tales aceites contienen una cantidad detectable de al menos un AGPI objetivo o primario que es el producto del sistema de PKS de AGPI. Adicionalmente, tales aceites están sustancialmente libres de productos intermedios o secundarios que no son los productos de AGPI objetivo o primarios y que no se producen de manera natural por el sistema de FAS endógeno en las plantas de tipo natural (es decir, las plantas de tipo natural producen AGPI de cadena algo más corta o de cadena media, tales como AGPI de 18 carbonos, por medio del sistema de FAS, pero habrá ácidos grasos nuevos, o adicionales, producidos en la planta como resultado de modificación genética con un sistema de PKS de AGPI). En otras palabras, en comparación con el perfil ácidos grasos totales de la planta de tipo natural (no modificada genéticamente) o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada, la mayoría de los ácidos grasos adicionales (ácidos grasos nuevos o ácidos grasos aumentados que resultan de la modificación genética) en el perfil de ácidos grasos totales producidos por las plantas que se han modificado genéticamente con un sistema de PKS de AGPI, comprenden los productos de AGPI objetivo o pretendidos del sistema de PKS de AGPI (es decir, la mayoría de ácidos grasos adicionales, o nuevos, en los ácidos grasos totales que se producen por la planta modificada genéticamente son el/los AGPI objetivo).

Además, estar "sustancialmente libre" de productos intermedios o secundarios del sistema para sintetizar AGPI, o no tener productos intermedios o secundarios presentes en cantidades sustanciales, significa que cualquier ácido graso como producto intermedio o secundario (AGPI no objetivo) que se produce en la planta (y/o partes de plantas y/o fracción de aceite de semilla) modificada genéticamente como resultado de la introducción o presencia del sistema enzimático para producir AGPI (es decir, que no se producen por la planta de tipo natural o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada), están presentes en una cantidad que es de menos de aproximadamente el 10% en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,5% en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta.

En una realización preferida, estar "sustancialmente libre" de productos intermedios o secundarios del sistema para sintetizar AGPI, o no tener productos intermedios o secundarios presentes en cantidades sustanciales, significa que cualquier ácido graso como producto intermedio o secundario que se produce en la planta (y/o partes de plantas y/o fracción de aceite de semilla) modificada genéticamente como resultado del sistema enzimático para producir los AGPI (es decir, que no se producen por la planta de tipo natural o por la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada para la producción de AGPI objetivo), están presentes en una cantidad que es de menos de aproximadamente el 10% en peso de los ácidos grasos adicionales totales producidos por la planta (definiéndose los ácidos grasos adicionales como aquellos ácidos grasos o niveles de ácidos grasos que no se producen de manera natural por la planta de tipo natural o por la planta original que se usa como receptor para la modificación genética indicada para la producción de AGPI objetivo), y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de los ácidos grasos adicionales totales producidos por la planta. Por tanto, al contrario que el perfil de ácidos grasos de plantas que se han modificado genéticamente para producir AGPI mediante la ruta habitual, la mayoría de los productos de ácidos grasos resultantes de la modificación genética con un sistema de PKS de AGPI serán los productos de ácidos grasos objetivo o pretendidos.

Cuando el producto objetivo de un sistema de PKS de AGPI es un AGPI de cadena larga, tal como DHA, DPA (n-6 o

n-3) o EPA, los productos intermedios y productos secundarios que no están presentes en cantidades sustanciales en los lípidos totales de plantas modificadas genéticamente con tal PKS de AGPI pueden incluir, pero no se limitan a: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6); ácido estearidónico (STA o SDA; 18:4, n-3); ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA o HGLA; 20:3, n-6), ácido araquidónico (ARA, C20:4, n-6); ácido eicosatrienoico (ETA; 20:3, n-9) y diversos otros productos intermedios o secundarios, tales como 20:0; 20:1 (Δ 5); 20:1 (Δ 11); 20:2 (Δ 8,11); 20:2 (Δ 11,14); 20:3 (Δ 5,11,14); 20:3 (Δ 11,14,17); ácido de Mead (20:3; Δ 5,8,11); o 20:4 (Δ 5,1,14,17). Además, cuando el producto objetivo es un AGPI particular, tal como DHA, los productos intermedios y productos secundarios que no están presentes en cantidades sustanciales en los lípidos totales de las plantas modificadas genéticamente también incluyen otros AGPI, incluyendo otros AGPI que son un producto natural de un sistema de PKS de AGPI diferente, tal como EPA en este ejemplo. Debe observarse que el sistema de PKS de AGPI de la presente invención también puede usarse, si se desea, para producir como AGPI objetivo un AGPI que puede incluir GLA, SDA o DGLA.

Usando el conocimiento de la base genética y la estructura de dominios del sistema de PKS de AGPI descrito en el presente documento, los presentes inventores han diseñado y producido constructos que codifican para un sistema de PKS de AGPI de este tipo y han producido satisfactoriamente plantas transgénicas que expresan el sistema de PKS de AGPI. Las plantas transgénicas producen aceites que contienen AGPI, y los aceites están sustancialmente libres de productos intermedios que se acumulan en una ruta de AGPI habitual. Los presentes inventores también han demostrado el uso de los constructos para producir AGPI en otro eucariota, la levadura, como experimento de prueba de concepto antes de la producción de las plantas transgénicas. Los ejemplos demuestran que la transformación tanto de levadura como de plantas con un sistema de PKS de AGPI que produce DHA y DPAn-6 como los AGPI objetivo produce ambos de estos AGPI como ácidos grasos adicionales primarios en los ácidos grasos totales de la planta (es decir, restando los ácidos grasos que se producen en la planta de tipo natural), y en la levadura y, además, que cualquier otro ácido graso que no está presente en los ácidos grasos de la planta de tipo natural o planta original son prácticamente indetectables. Se describen en detalle a continuación características específicas de plantas modificadas genéticamente y partes y aceites de las mismas de la presente invención.

Según la presente invención, una planta modificada genéticamente incluye una planta que se ha modificado usando tecnología recombinante, que puede combinarse con técnicas de mutagénesis y selección clásicas. Tal como se usa en el presente documento, modificaciones genéticas que dan como resultado una disminución en la expresión génica, en la función del gen, o en la función del producto génico (es decir, la proteína codificada por el gen) pueden denominarse inactivación (completa o parcial), delección, interrupción, bloqueo o regulación por disminución de un gen. Por ejemplo, una modificación genética en un gen que da como resultado una disminución en la función de la proteína codificada por tal gen, puede ser el resultado de una delección completa del gen (es decir, el gen no existe, y por tanto la proteína no existe), una mutación en el gen que da como resultado una traducción incompleta de la proteína o ausencia de la misma (por ejemplo, la proteína no se expresa), o una mutación en el gen que disminuye o suprime la función natural de la proteína (por ejemplo, se expresa una proteína que tiene una actividad o acción enzimática disminuida o ausencia de la misma). Modificaciones genéticas que dan como resultado un aumento en la expresión o función génica pueden denominarse amplificación, sobreproducción, sobreexpresión, activación, potenciación, adición o regulación por incremento de un gen.

La modificación genética de una planta según la presente invención da como resultado la producción de uno o más AGPI por la planta. El perfil de AGPI y la razón del AGPI producidos por la planta no es necesariamente el mismo que el perfil de AGPI o la razón de AGPI producidos por el organismo del que se derivó el sistema de PKS de AGPI.

Con respecto a la producción de plantas modificadas genéticamente, se conocen bien en la técnica métodos para la modificación por ingeniería genética de plantas. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, incluyendo protocolos de transformación biológica y física para plantas dicotiledóneas así como plantas monocotiledóneas (por ejemplo Goto-Fumiyuki *et al.*, 1999, Nature Biotech 17: 282-286). Véase, por ejemplo, Miki *et al.*, "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. y Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1993) págs. 67-88. Además, están disponibles vectores y métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de tejido o células de plantas y la regeneración de plantas. Véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. y Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1993) págs. 89-119.

El método más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. Véase, por ejemplo, Horsch *et al.*, Science 227:1229 (1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente células de plantas. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Véase, por ejemplo, Kado, C.I., Crit. Rev. Plant. Sci. 10:1 (1991). Numerosas referencias proporcionan descripciones de sistemas de vector de *Agrobacterium* y métodos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium*, incluyendo Gruber *et al.*, citado anteriormente, Miki *et al.*, citado anteriormente, Moloney *et al.*, Plant Cell Reports 8:238 (1989) y las patentes estadounidenses n.^{os} 4.940.838 y 5.464.763.

Otro método generalmente aplicable de transformación de plantas es transformación mediada por microproyectiles

en el que se porta ADN sobre la superficie de microproyectiles. El vector de expresión se introduce en tejidos de plantas con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles hasta velocidades suficientes para penetrar en las membranas y paredes de células de plantas. Sanford *et al.*, Part. Sci. Technol. 5:27 (1987), Sanford, J.C., Trends Biotech. 6:299 (1988), Sanford, J.C., Physiol. Plant 79:206 (1990), Klein *et al.*, Biotechnology 10:268 (1992).

5 Otro método para el suministro físico de ADN a plantas es la sonicación de células diana. Zhang *et al.*, Bio/Technology 9:996 (1991). Alternativamente, se ha usado la fusión de esferoplastos o liposomas para introducir vectores de expresión en plantas. Deshayes *et al.*, EMBO J., 4:2731 (1985), Christou *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:3962 (1987). También se ha notificado la captación directa de ADN en protoplastos usando precipitación
10 con CaCl₂, poli(alcohol vinílico) o poli-L-ornitina. Hain *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199:161 (1985) y Draper *et al.*, Plant Cell Physiol. 23:451 (1982). También se ha descrito la electroporación de protoplastos y tejidos y células completas. Donn *et al.*, en Abstracts of VIIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, pág. 53 (1990); D'Halluin *et al.*, Plant Cell 4:1495-1505 (1992) y Spencer *et al.*, Plant Mol. Biol. 24:51-61 (1994). Adicionalmente, pueden usarse fibras cortas monocristalinas de carburo de silicón (Kaepler *et al.*, 1990, Plant Cell Reports) y en la transformación de plantas usando, por ejemplo, una metodología de inmersión de flores (Clough y Bent, 1998, Plant J. 16: 735 - 743).

La metodología de transformación de plantas exacta puede variar algo dependiendo de la especie de planta seleccionada y el tipo de células de planta seleccionada para la transformación (por ejemplo tipos de células derivadas de plántulas tales como hipocótilos y cotiledones o tejido embrionario).

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento en una realización la planta seleccionada es cártamo. Se ha descrito una metodología para obtener transformantes de cártamo en Baker y Dyer (Plant Cell Reports, 1996, 16: 106 - 110).

25 Tras la introducción del constructo genético en células de plantas, se hacen crecer células de plantas y tras la aparición de tejido de diferenciación tal como brotes y raíces, se generan plantas maduras. Normalmente se genera una pluralidad de plantas. Los expertos en la técnica conocerán generalmente metodologías para regenerar plantas y pueden encontrarse por ejemplo en: Plant Cell and Tissue Culture, 1994, Vasil y Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers y en: Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology 111, 1999 Hall Eds Humana Press).

Por consiguiente, se abarcan por la presente invención métodos para modificar genéticamente células de plantas haciendo uso de genes de determinadas bacterias marinas y cualquier sistema de PKS de AGPI de traustequitridio u otro eucariota, y además puede utilizarse el mezclado de genes para extender y/o alterar la gama de productos de
35 AGPI para incluir EPA, DHA, DPA (n-3 o n-6), ARA, GLA, SDA y otros. El método para obtener estos perfiles de producción de AGPI alterados incluye no sólo el mezclado de genes de diversos organismos en los genes de PKS de AGPI de traustequitridio, sino también diversos métodos de modificación genética de los genes de PKS de AGPI de traustequitridio endógenos dados a conocer en el presente documento. El conocimiento de la base genética y la estructura de dominios del sistema de PKS de AGPI de traustequitridio y el sistema de PKS de AGPI de bacterias marinas proporciona una base para diseñar organismos modificados genéticamente novedosos que producen una
40 variedad de perfiles de AGPI. Pueden aislarse constructos de PKS de AGPI novedosos preparados en microorganismos tales como un traustequitridio o en *E. coli* y usarse para transformar plantas para conferir propiedades de producción de AGPI similares en las plantas. Se exponen discusiones detalladas de modificaciones particulares de sistemas de PKS de AGPI que se abarcan por la presente invención, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995.

Una planta modificada genéticamente se cultiva preferiblemente en un medio de fermentación o se hace crecer en un medio adecuado tal como suelo. Un medio de fermentación apropiado, o eficaz, se ha comentado en detalle
50 anteriormente. Un medio de crecimiento adecuado para plantas superiores incluye cualquier medio de crecimiento para plantas, incluyendo, pero sin limitarse a, suelo, arena, cualquier otro medio particulado que soporte el crecimiento de raíces (por ejemplo vermiculita, perlita, etc.) o cultivo hidropónico, así como luz, agua y complementos nutricionales adecuados que optimizan el crecimiento de la planta superior. Las plantas modificadas genéticamente de la presente invención se modifican por ingeniería genética para producir AGPI mediante la actividad del sistema de PKS de AGPI. Los AGPI pueden recuperarse mediante procedimientos de purificación que extraen los compuestos de la planta. En una realización preferida, los AGPI se recuperan cosechando la planta. En una realización particularmente preferida, los AGPI se recuperan cosechando el aceite de la planta (por ejemplo, de las semillas oleaginosas). La planta también puede consumirse en su estado natural o procesarse adicionalmente para obtener productos consumibles.

60 Preferiblemente, una planta modificada genéticamente de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados incluyendo, pero sin limitarse a, EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6), ALA (C18:3, n-3) y/o SDA (C18:4, n-3)), y más preferiblemente, uno o más ácidos grasos de cadena larga (AGPICL), incluyendo, pero sin limitarse a, EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3) o DTA (C22:4, n-6). En una realización particularmente preferida, una planta modificada genéticamente de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados incluyendo, pero sin limitarse a,

EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3) y/o DPA (C22:5, n-6 o n-3).

Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere a una planta, y preferiblemente una planta de semillas oleaginosas, en la que la planta produce (por ejemplo, en sus semillas maduras, si es una planta de semillas oleaginosas, o en el aceite de las semillas de una planta de semillas oleaginosas) al menos un AGPI (el AGPI objetivo), y en la que el perfil de ácidos grasos totales en la planta, o la parte de la planta que acumula AGPI (por ejemplo, semillas maduras, si la planta es una planta de semillas oleaginosas o el aceite de las semillas de una planta de semillas oleaginosas), comprende una cantidad detectable de estos AGPI. Preferiblemente, el AGPI objetivo es un AGPI de al menos 20 carbonos y comprende al menos 3 dobles enlaces, y más preferiblemente al menos 4 dobles enlaces, e incluso más preferiblemente, al menos 5 dobles enlaces. Además, el AGPI objetivo es preferiblemente un AGPI que no se produce de manera natural por la planta (es decir, la planta de tipo natural en ausencia de modificación genética o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada). Preferiblemente, el perfil de ácidos grasos totales en la planta o en la parte de la planta que acumula AGPI (incluyendo el aceite de semilla de la planta) comprende al menos el 0,1% del/de los AGPI objetivo en peso de los ácidos grasos totales, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 0,2%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 0,3%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 0,4%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 0,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 1%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 1,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 2%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 2,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 3%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 3,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 4%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 5,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 10%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 15%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 35%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 45%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 55%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 65%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, y más preferiblemente más del 75% de al menos un ácido graso poliinsaturado (el/los AGPI objetivo) en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, o cualquier porcentaje de desde el 0,1% hasta el 75%, o más del 75% (hasta el 100% o aproximadamente el 100%), en incrementos del 0,1%, del/de los AGPI objetivo. Tal como se usa generalmente en el presente documento, la referencia a una cantidad en porcentaje de producción de AGPI es en peso de los ácidos grasos totales producidos por el organismo (planta), a menos que se establezca otra cosa (por ejemplo, en algunos casos, el porcentaje en peso es relativo a los ácidos grasos totales producidos por un complejo enzimático, tal como un sistema de PKS de AGPI). En una realización, los ácidos grasos totales producidos por una planta se presentan como un tanto por ciento en peso tal como se determina mediante análisis de cromatografía de gases (CG) de una preparación de éster metílico de ácido graso (EMAG), aunque la determinación de los ácidos grasos totales no se limita a este método.

Tal como se describió anteriormente, es una característica adicional de los ácidos grasos totales producidos por la planta descrita anteriormente (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) que estos ácidos grasos totales producidos por la planta comprendan menos de (o no contengan más del) aproximadamente el 10% en peso de cualquier ácido graso, distinto del/de los AGPI objetivo que se producen por el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo. Preferiblemente, cualquier ácido graso que se produce por el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo (por ejemplo, como resultado de la modificación genética de la planta con la enzima o el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo), distinto(s) del/de los AGPI objetivo, está presente a menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta.

En otra realización, cualquier ácido graso que se produce por el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo distinto del/de los AGPI objetivo está presente a menos de (o no contiene más del) aproximadamente el 10% en peso de los ácidos grasos totales que se producen por el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo en la planta (es decir, esta medición se limita a los ácidos grasos totales que se producen por el complejo enzimático que produce el AGPI objetivo), y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% en peso de los ácidos grasos totales, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 0,5% en peso de los ácidos grasos totales que se producen por el complejo enzimático que produce el/los AGPI objetivo en la planta.

En otro aspecto de esta realización de la invención, los ácidos grasos totales producidos por la planta (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) contienen menos del (o no contienen más del) 10% de AGPI que tienen 18 o más carbonos en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, distintos del/de los AGPI objetivo o de los AGPI que están presentes en la planta de tipo natural (no modificada genéticamente) o en la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada. En aspectos adicionales, los ácidos grasos totales producidos por la planta (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) contienen menos del 9% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 8% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 7% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 6% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 5% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 4% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 3% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 2% de AGPI que tienen 18 o más carbonos, o menos del 1% de AGPI que tienen 18 o más carbonos en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, distintos del/de los AGPI objetivo o de los AGPI que están presentes en la planta de tipo natural (no modificada genéticamente) o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada.

En otro aspecto de esta realización de la invención, los ácidos grasos totales producidos por la planta (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) contienen menos del (o no contienen más del) 10% de AGPI que tienen 20 o más carbonos en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, distintos del/de los AGPI objetivo o de los AGPI que están presentes en la planta de tipo natural (no modificada genéticamente) o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada. En aspectos adicionales, los ácidos grasos totales producidos por la planta (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) contienen menos del 9% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 8% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 7% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 6% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 5% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 4% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 3% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 2% de AGPI que tienen 20 o más carbonos, o menos del 1% de AGPI que tienen 20 o más carbonos en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, distintos del/de los AGPI objetivo o de los AGPI que están presentes en la planta de tipo natural (no modificada genéticamente) o la planta original usada como receptor para la modificación genética indicada.

En una realización, los ácidos grasos totales en la planta (y/o partes de plantas o fracción de aceite de semilla) contienen menos de aproximadamente el 10% en peso de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de un ácido graso seleccionado de uno cualquiera o más de: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6); ácido estearidónico (STA o SDA; 18:4, n-3); ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA o HGLA; 20:3, n-6), ácido araquidónico (ARA, C20:4, n-6); ácido eicosatrienoico (ETA; 20:3, n-9) y diversos otros ácidos grasos, tales como 20:0; 20:1 (Δ 5); 20:1 (Δ 11); 20:2 (Δ 8,11); 20:2 (Δ 11,14); 20:3 (Δ 5,11,14); 20:3 (Δ 11,14,17); ácido de Mead (20:3; Δ 5,8,11); o 20:4 (Δ 5,1,14,17).

En otra realización, los ácidos grasos que se producen por el sistema enzimático que produce los AGPI de cadena larga en la planta contienen menos de aproximadamente el 10% en peso de un ácido graso seleccionado de: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6); ácido estearidónico (STA o SDA; 18:4, n-3); ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA o HGLA; 20:3, n-6), ácido araquidónico (ARA, C20:4, n-6); ácido eicosatrienoico (ETA; 20:3, n-9) y diversos otros ácidos grasos, tales como 20:0; 20:1 (Δ 5); 20:1 (Δ 11); 20:2 (Δ 8,11); 20:2 (Δ 11,14); 20:3 (Δ 5,11,14); 20:3 (Δ 11,14,17); ácido de Mead (20:3; Δ 5,8,11); o 20:4 (Δ 5,1,14,17), como porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de un ácido graso seleccionado de: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6); ácido estearidónico (STA o SDA; 18:4, n-3); ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA o HGLA; 20:3, n-6), ácido araquidónico (ARA, C20:4, n-6); ácido eicosatrienoico (ETA; 20:3, n-9) y diversos otros ácidos grasos, tales como 20:0; 20:1 (Δ 5); 20:1 (Δ 11); 20:2 (Δ 8,11); 20:2 (Δ 11,14); 20:3 (Δ 5,11,14); 20:3 (Δ 11,14,17); ácido de Mead (20:3; Δ 5,8,11); o 20:4 (Δ 5,1,14,17).

En otra realización, los ácidos grasos que se producen por el sistema enzimático que produce los AGPI de cadena larga en la planta contienen menos de aproximadamente el 10% en peso de todos de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono, como porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente

el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de todos de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono.

5 En otra realización, los ácidos grasos que se producen por el sistema enzimático que produce los AGPI de cadena larga en la planta contienen menos de aproximadamente el 10% en peso de cada uno de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles
10 enlaces carbono-carbono, como porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de cada uno de los siguientes AGPI: ácido gamma-
15 linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono.

20 En otra realización, los ácidos grasos que se producen por el sistema enzimático que produce los AGPI de cadena larga en la planta contienen menos de aproximadamente el 10% en peso de uno cualquiera o más de los siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos
25 o tres dobles enlaces carbono-carbono, como porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por la planta, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 9%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 8%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 7%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 6%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 4%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de uno cualquiera o más de los
30 siguientes AGPI: ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3, n-6), AGPI que tienen 18 carbonos y cuatro dobles enlaces carbono-carbono, AGPI que tienen 20 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono, y AGPI que tienen 22 carbonos y dos o tres dobles enlaces carbono-carbono.

35 En un aspecto de esta realización de la invención, la planta produce al menos dos AGPI objetivo, y el perfil de ácidos grasos totales en la planta, o la parte de la planta que acumula AGPI (incluyendo aceites de las semillas oleaginosas), comprende una cantidad detectable de estos AGPI. En esta realización, los AGPI son preferiblemente cada uno al menos un AGPI de 20 carbonos y comprenden al menos 3 dobles enlaces, y más preferiblemente al menos 4 dobles enlaces, e incluso más preferiblemente, al menos 5 dobles enlaces. Tales AGPI se eligen lo más preferiblemente de DHA, DPAn-6 y EPA. En un aspecto, la planta produce DHA y DPAn-6, y la razón de DHA con
40 respecto a DPAn-6 es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1, incluyendo cualquier razón entre las mismas. En una realización, la razón de DHA con respecto a DPA es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1, y en otra realización, de aproximadamente 2,5:1. En una realización, la planta produce DHA y EPA.

45 En otro aspecto de esta realización de la invención, la planta produce el perfil de ácidos grasos totales representado por la figura 13 o la figura 14.

La invención incluye además cualquier semilla producida por las plantas descritas en el presente documento, así como cualquier aceite producido por las plantas o semillas descritas en el presente documento. La invención también incluye cualquier producto producido usando las plantas, semilla o aceites descritos en el presente
50 documento.

Usos para organismos modificados genéticamente de la invención

55 Una realización de la presente invención es un método para producir moléculas bioactivas deseadas (también denominadas productos o compuestos) haciendo crecer o cultivando un organismo modificado genéticamente (por ejemplo, un microorganismo o una planta) de la presente invención (descrito en detalle anteriormente). Preferiblemente, la molécula bioactiva es un AGPI, y lo más preferiblemente, un AGPICL. Preferiblemente, el organismo modificado genéticamente es un microorganismo modificado genéticamente o una planta modificada genéticamente. Un método de este tipo incluye, por ejemplo, la etapa de cultivar en un medio de fermentación o
60 hacer crecer en un entorno adecuado, tal como suelo, un microorganismo o una planta, respectivamente, que tiene una modificación genética tal como se describió anteriormente en el presente documento y según la presente invención. Se describen anteriormente organismos y células huésped preferidos para la modificación genética relacionada con el sistema de PKS de AGPI de la invención.

65 Una realización de la presente invención es un método para producir AGPI deseados cultivando un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención (descrito en detalle anteriormente). Un método de este tipo

incluye la etapa de cultivar en un medio de fermentación y en condiciones eficaces para producir el/los AGPI un microorganismo que tiene una modificación genética tal como se describió anteriormente en el presente documento y según la presente invención. Un medio apropiado, o eficaz, se refiere a cualquier medio en el que un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención, cuando se cultiva, puede producir el/los producto(s) de AGPI deseado(s). Un medio de este tipo es normalmente un medio acuoso que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables. Un medio de este tipo puede incluir también sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados. Cualquier microorganismo de la presente invención puede cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales. Los microorganismos pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento de fermentación que incluye, pero no se limita a, fermentación discontinua, de alimentación discontinua, de recirculación celular y continua. Se conocen bien en la técnica condiciones de crecimiento preferidas para microorganismos traustoquitridios según la presente invención y se describen en detalle, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.130.242, la patente estadounidense n.º 5.340.742 y la patente estadounidense n.º 5.698.244, cada de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Los AGPI deseados y/u otras moléculas bioactivas producidas por el microorganismo modificado genéticamente pueden recuperarse del medio de fermentación usando técnicas de separación y purificación convencionales. Por ejemplo, el medio de fermentación puede filtrarse o centrifugarse para eliminar microorganismos, residuos celulares y otra materia particulada, y el producto puede recuperarse del sobrenadante libre de células mediante métodos convencionales, tales como, por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía, extracción, extracción con disolvente, separación de fases, separación por membrana, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, derivatización química y cristalización. Alternativamente, pueden usarse microorganismos que producen el/los AGPI, o extractos y diversas fracciones de los mismos, sin la eliminación de los componentes de microorganismo del producto.

Preferiblemente, se producen AGPI en una cantidad que es mayor de aproximadamente el 5% del peso seco del microorganismo, y en un aspecto, en una cantidad que es mayor del 6%, y en otro aspecto, en una cantidad que es mayor del 7%, y en otro aspecto, en una cantidad que es mayor del 8%, y en otro aspecto, en una cantidad que es mayor del 9%, y en otro aspecto, en una cantidad que es mayor del 10%, y así sucesivamente en porcentajes de números enteros completos, hasta más del 90% de peso seco del microorganismo (por ejemplo, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, y cualquier porcentaje entre los mismos).

Preferiblemente, se producen compuestos bioactivos de interés por el microorganismo modificado genéticamente en una cantidad que es mayor de aproximadamente el 0,05%, y preferiblemente mayor de aproximadamente el 0,1%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 0,25%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 0,5%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 0,75%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 1%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 2,5%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 5%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 10%, y más preferiblemente mayor de aproximadamente el 15%, e incluso más preferiblemente mayor de aproximadamente el 20% del peso seco del microorganismo. Para compuestos lipídicos, preferiblemente, tales compuestos se producen en una cantidad que es mayor de aproximadamente el 5% del peso seco del microorganismo. Para otros compuestos bioactivos, tales como antibióticos o compuestos que se sintetizan en cantidades más pequeñas, las cepas que presentan tales compuestos con respecto al peso seco del microorganismo se identifica de manera predictiva que contienen un sistema de PKS novedoso del tipo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, se secretan moléculas bioactivas particulares (compuestos) por el microorganismo, en vez de acumularse. Por tanto, tales moléculas bioactivas se recuperan generalmente del medio de cultivo y la concentración de molécula producida variará dependiendo del microorganismo y el tamaño del cultivo.

En el método para la producción de compuestos bioactivos deseados de la presente invención, se cultiva una planta modificada genéticamente en un medio de fermentación o se hace crecer en un medio adecuado tal como suelo. Un medio de fermentación apropiado, o eficaz, se ha comentado en detalle anteriormente. Un medio de crecimiento adecuado para plantas superiores incluye cualquier medio de crecimiento para plantas, incluyendo, pero sin limitarse a, suelo, arena, cualquier otro medio particulado que soporte el crecimiento de raíces (por ejemplo vermiculita, perlita, etc.) o cultivo hidropónico, así como luz, agua y complementos nutricionales adecuados que optimizan el crecimiento de la planta superior. Las plantas modificadas genéticamente de la presente invención se modifican por ingeniería genética para producir cantidades significativas del producto deseado mediante la actividad del sistema de PKS de AGPI y otras proteínas heterólogas (proteínas auxiliares al sistema de PKS de AGPI) según la presente invención. Los compuestos pueden recuperarse mediante procedimientos de purificación que extraen los compuestos de la planta. En una realización preferida, el compuesto se recupera cosechando la planta. En esta realización, la planta puede consumirse en su estado natural o procesarse adicionalmente para obtener productos consumibles.

La invención incluye además cualquier organismo o partes del mismo descrito en el presente documento (por ejemplo, microorganismos y preparaciones o fracciones de los mismos o plantas, partes de las plantas (por ejemplo, semillas oleaginosas), o preparaciones o fracciones de los mismos), así como cualquier aceite producido por el organismo descrito en el presente documento. La invención también incluye cualquier producto producido usando los organismos, partes de los mismos o aceites descritos en el presente documento.

Una realización de la presente invención se refiere a un método para modificar un producto que contiene al menos un ácido graso, que comprende añadir al producto un organismo, parte del mismo o un aceite producido por un organismo modificado genéticamente según la invención y tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, una planta o un microorganismo que se ha modificado genéticamente con un sistema de PKS de AGPI, hace uso de cualquiera de las estrategias para la mejora de la producción y/o acumulación de AGPI descritas en el presente documento, y tiene un perfil de ácidos grasos descrito en el presente documento). Cualquier producto producido mediante este método o que contiene generalmente cualquier organismo, partes del mismo o aceites de los organismos descritos en el presente documento también se abarcan por la invención.

Preferiblemente, el producto se selecciona del grupo que consiste en un alimento, un suplemento dietético, una formulación farmacéutica, una leche de animal humanizada y un preparado para lactantes. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, una formulación antiinflamatoria, un agente quimioterápico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco anti-*Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico y una formulación hipocolesterolemiante. En una realización, el producto se usa para tratar un estado seleccionado del grupo que consiste en: inflamación crónica, inflamación aguda, trastorno gastrointestinal, cáncer, caquexia, reestenosis cardiaca, trastorno neurodegenerativo, trastorno degenerativo del hígado, trastorno de lípidos sanguíneos, osteoporosis, osteoartritis, enfermedad autoinmunitaria, preeclampsia, parto prematuro, maculopatía relacionada con la edad, trastorno pulmonar y trastorno peroxisomal.

Los productos alimenticios adecuados incluyen, pero no se limitan a, productos de panadería fina, pan y bollos, cereales para el desayuno, queso procesado y sin procesar, condimentos (*ketchup*, mayonesa, etc.), productos lácteos (leche, yogur), pudines y postres de gelatina, bebidas carbonatadas, té, mezclas de bebida en polvo, productos de pescado procesados, bebidas a base de frutas, chicle, dulces duros, productos lácteos congelados, productos cárnicos procesados, frutos secos y cremas para untar a base de frutos secos, pasta, productos avícolas procesados, jugos y salsas, *snacks* de patatas fritas y otros *snacks*, chocolate y otros dulces, sopas y mezclas de sopa, productos a base de soja (leches, bebidas, natas, sustitutos lácteos para el café), cremas para untar a base de aceite vegetal y bebidas a base de verduras.

Directrices y definiciones generales

Según la presente invención, una proteína aislada es una proteína o un fragmento de la misma (incluyendo un polipéptido o péptido) que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de manera recombinante y proteínas producidas de manera sintética, por ejemplo. Como tal, "aislado" no refleja el grado en que se ha purificado la proteína. Preferiblemente, una proteína aislada de la presente invención se produce de manera recombinante. Un péptido aislado puede producirse de manera sintética (por ejemplo, de manera química, tal como mediante síntesis de péptidos) o de manera recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos" incluye fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; triacilgliceroles; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; jabones; fosfátidos; ceras (ésteres de alcoholes y ácidos grasos); esteroides y ésteres de esteroles; carotenoides; xantofilas (por ejemplo, oxocarotenoides); hidrocarburos; y otros lípidos conocidos por un experto habitual en la técnica. Los términos "ácido graso poliinsaturado" y "AGPI" incluyen no sólo la forma de ácido graso libre, sino otras formas también, tales como la forma de TAG y la forma de PL.

La referencia a una proteína particular de un organismo específico o a una proteína particular que está derivándose de un organismo específico, tal como una "ACoAS de *Schizochytrium*" o una "ACoAS derivada de *Schizochytrium*", a modo de ejemplo, se refiere a una ACoAS (incluyendo un homólogo de la ACoAS que se produce de manera natural) de un *Schizochytrium* o una ACoAS que se ha producido de otra forma a partir del conocimiento de la estructura (por ejemplo, secuencia) de una ACoAS que se produce de manera natural de *Schizochytrium*. En otras palabras, una ACoAS de *Schizochytrium* incluye cualquier ACoAS que tenga la estructura y función de una ACoAS que se produce de manera natural de *Schizochytrium* o que tenga una estructura y función que es suficientemente similar a una ACoAS de *Schizochytrium* de manera que la ACoAS es un homólogo biológicamente activo (es decir, tiene actividad biológica) de una ACoAS que se produce de manera natural de *Schizochytrium*. Como tal, una ACoAS de *Schizochytrium* puede incluir proteínas purificadas, parcialmente purificadas, recombinantes, mutadas/modificadas y sintéticas.

Según la presente invención, los términos "modificación" y "mutación" pueden usarse de manera intercambiable, particularmente con respecto a las modificaciones/mutaciones en las secuencias de aminoácidos primarias de una proteína o péptido (o secuencias de ácido nucleico) descritas en el presente documento. El término "modificación" también puede usarse para describir modificaciones postraduccionales en una proteína o un péptido incluyendo, pero sin limitarse a, metilación, farnesilación, carboximetilación, geranil-geranilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación y/o amidación. Las modificaciones también pueden incluir, por ejemplo, la complejación de una proteína o un péptido con otro compuesto. Tales modificaciones pueden

considerarse que son mutaciones, por ejemplo, si la modificación es diferente de la modificación postraduccional que se produce en la proteína o el péptido natural, de tipo natural.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “homólogo” se usa para referirse a una proteína o un péptido que difiere de una proteína o un péptido que se produce de manera natural (es decir, la proteína “prototipo” o “de tipo natural”) en una o más modificaciones o mutaciones menores con respecto a la proteína o el péptido que se produce de manera natural, pero que mantiene la estructura de cadenas laterales y proteína básica global de la forma que se produce de manera natural (es decir, de manera que el homólogo puede identificarse que está relacionado con la proteína de tipo natural). Tales cambios incluyen, pero no se limitan a: cambios en una o unas 10 cuantas (por ejemplo, el 1% o menos) cadenas laterales de aminoácido; cambios en uno o unos cuantos (por ejemplo, el 1% o menos) aminoácidos, incluyendo deleciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o el péptido), inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o unos cuantos (por ejemplo, el 1% o menos) átomos; y/o derivatizaciones menores, incluyendo pero sin limitarse a: metilación, farnesilación, geranylgeranilación, glicosilación, carboximetilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación y/o amidación. Un homólogo puede tener propiedades o bien potenciadas, disminuidas o bien sustancialmente similares 15 en comparación con la proteína o el péptido que se produce de manera natural. Se describen en detalle a continuación homólogos de una proteína. Se observa que los homólogos pueden incluir homólogos producidos de manera sintética, variantes alélicas que se producen de manera natural de una proteína dada o dominio de la misma, o secuencias homólogas de organismos distintos del organismo del que se derivó la secuencia de referencia. 20

Las sustituciones conservativas incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina; serina y treonina; 25 lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. También pueden hacerse sustituciones basándose en la hidrofobicidad o hidrofiliidad conservada (Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105 (1982)), o basándose en la capacidad para asumir una estructura secundaria de polipéptido similar (Chou y Fasman, Adv. Enzymol. 47: 45 (1978)).

Los homólogos pueden ser el resultado de variación alélica natural o mutación natural. Una variante alélica que se produce de manera natural de un ácido nucleico que codifica para una proteína es un gen que aparece 30 esencialmente en el mismo locus (o loci) en el genoma que el gen que codifica para tal proteína, pero que, debido a variaciones naturales provocadas por, por ejemplo, mutación o recombinación, tiene una secuencia similar pero no idéntica. Las variantes alélicas codifican normalmente para proteínas que tienen una actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con la que están comparándose. Una clase de variantes alélicas puede codificar para la misma proteína pero tener secuencias de ácido nucleico diferentes debido a la degeneración del código genético. 35 Las variantes alélicas también pueden comprender alteraciones en las regiones no traducidas en 5' o 3' del gen (por ejemplo, en regiones de control regulatorio). Los expertos en la técnica conocen bien variantes alélicas.

Pueden producirse homólogos usando técnicas conocidas en la técnica para la producción de proteínas incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones directas en la proteína aislada, que se produce de manera natural, síntesis de 40 proteínas directa o modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína usando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante o clásicas para efectuar mutagénesis dirigida o al azar.

Modificaciones o mutaciones en homólogos de proteínas, en comparación con la proteína de tipo natural, o bien aumentan, disminuyen o bien no cambian sustancialmente la actividad biológica básica del homólogo en 45 comparación con la proteína que se produce de manera natural (de tipo natural). En general, la actividad biológica o acción biológica de una proteína se refiere a cualquier función presentada o realizada por la proteína tal como se le atribuye a la forma que se produce de manera natural de la proteína tal como se mide o se observa *in vivo* (es decir, en el entorno fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio). Las actividades biológicas de sistemas de PKS de AGPI y las proteínas/los dominios individuales que constituyen un sistema de 50 PKS de AGPI se han descrito en detalle en otra parte en el presente documento y en las patentes y solicitudes a las que se hace referencia. Las actividades biológicas de una ACoAS incluyen unión a un sustrato, y preferiblemente para la presente invención, un ácido graso libre (AGL) de un AGPI, y catalización de la conversión del AGL en un acil-CoA AGPI.

55 Modificaciones de una proteína, tal como en un homólogo, pueden dar como resultado proteínas que tienen la misma actividad biológica que la proteína que se produce de manera natural, o proteínas que tienen actividad biológica disminuida o aumentada en comparación con la proteína que se produce de manera natural. Modificaciones que dan como resultado una disminución en la expresión de la proteína o una disminución en la actividad de la proteína, pueden denominarse inactivación (completa o parcial), regulación por disminución o acción 60 (o actividad) disminuida de una proteína. De manera similar, modificaciones que dan como resultado un aumento en la expresión de la proteína o un aumento en la actividad de la proteína, pueden denominarse amplificación, sobreproducción, activación, potenciación, regulación por incremento o acción (o actividad) aumentada de una proteína. Se observa que la referencia general a un homólogo que tiene la actividad biológica de la proteína de tipo natural no significa necesariamente que el homólogo tenga una actividad biológica idéntica que la proteína de tipo 65 natural, particularmente con respecto al nivel de actividad biológica. Más bien, un homólogo puede realizar la misma actividad biológica que la proteína de tipo natural, pero a un nivel de actividad reducido o aumentado en

comparación con la proteína de tipo natural. Un dominio funcional de una proteína es un dominio (es decir, un dominio puede ser una parte de una proteína) que puede realizar una función biológica (es decir, tiene actividad biológica).

5 Los métodos de detección de una proteína o de medición de la actividad de una proteína incluyen, pero no se limitan a, la medición de la transcripción de la proteína, la medición de la traducción de la proteína, la medición de la modificación postraduccional de la proteína, la medición de la actividad enzimática de la proteína y/o la medición de la producción de uno o más productos que resultan de la actividad de la proteína (por ejemplo, producción de AGPI). Se observa que una proteína aislada de la presente invención (incluyendo un homólogo) no se requiere
10 necesariamente que tenga la actividad biológica de la proteína de tipo natural. Por ejemplo, una proteína puede ser una proteína truncada, mutada o inactiva, por ejemplo. Tales proteínas son útiles en ensayos de selección, por ejemplo, o para otros fines tales como producción de anticuerpos. En una realización preferida, las proteínas aisladas de la presente invención tienen una actividad biológica que es similar a la de la proteína de tipo natural (aunque no necesariamente equivalente, tal como se comentó anteriormente).

15 Los métodos para medir los niveles de expresión de proteínas incluyen generalmente, pero no se limitan a: inmunotransferencia de tipo Western, inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas mediante desorción/ionización por láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, micromatriz, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo, así como ensayos basados en una propiedad de la proteína incluyendo pero sin limitarse a actividad enzimática o interacción con otras parejas proteicas. Los ensayos de unión también se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una máquina BIAcore para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación para el complejo puede
20 determinarse monitorizando los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo a medida que pasa un tampón sobre el chip (O’Shannessy *et al.* Anal. Biochem. 212:457-468 (1993); Schuster *et al.*, Nature 365:343-347 (1993)). Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tales como los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA); o la determinación de la unión monitorizando el cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de la proteínas a través de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear (RMN).

En un aspecto de la invención, una proteína abarcada por la presente invención, incluyendo un homólogo de una proteína particular descrita en el presente documento, comprende una secuencia de aminoácidos que incluye al menos aproximadamente 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia, en la que la secuencia de aminoácidos del homólogo tiene una actividad biológica de la proteína tal como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional, la secuencia de aminoácidos de la proteína comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos consecutivos, y más preferiblemente al menos aproximadamente 300 aminoácidos consecutivos, y más preferiblemente al menos aproximadamente 400 aminoácidos consecutivos, y puede incluir 500 aminoácidos consecutivos, o más de la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia, hasta la longitud completa de la proteína, incluyendo cualquier incremento que sea un número entero completo (por ejemplo, 200, 201, 202, 203, etc.).

Según la presente invención, el término “contiguo” o “consecutivo”, con respecto a secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico descritas en el presente documento, significa que están conectadas en una secuencia ininterrumpida. Por ejemplo, que una primera secuencia comprenda 30 aminoácidos contiguos (o consecutivos) de una segunda secuencia, significa que la primera secuencia incluye una secuencia ininterrumpida de 30 residuos de aminoácido que es idéntica al 100% a una secuencia ininterrumpida de 30 residuos de aminoácido en la segunda secuencia. De manera similar, que una primera secuencia tenga una “identidad del 100%” con una segunda secuencia significa que la primera secuencia coincide exactamente con la segunda secuencia sin huecos entre nucleótidos o aminoácidos.

50 Normalmente, un homólogo de una proteína de referencia, tal como cualquiera de las proteínas ACoAS descritas en el presente documento, tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 50%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 55%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 60%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 65%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 70%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 75%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 80%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 85%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 95%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 96%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 97%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 98%, y más preferiblemente idéntica en al menos aproximadamente el 99% (o cualquier porcentaje entre el 60% y el 99%, en incrementos en porcentaje individuales completos) a la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia (por ejemplo, a una proteína ACoAS). El homólogo tiene preferiblemente una actividad biológica de la proteína o el dominio del que se deriva o con el que está relacionado (es decir, la proteína o el dominio que tiene la secuencia de aminoácidos de referencia). Con respecto a homólogos de ACoAS, el homólogo tiene preferiblemente actividad enzimática de ACoAS, y más específicamente, la capacidad para catalizar la conversión de ácidos grasos libres

(AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA. Con respecto a otras proteínas auxiliares descritas en el presente documento, tales proteínas pueden tener la actividad biológica de, por ejemplo, utilizar AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, la referencia a un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de la homología que se realiza usando: (1) una búsqueda de homología BLAST 2.0 Basic BLAST usando blastp para búsquedas de aminoácidos, blastn para búsquedas de ácidos nucleicos y blastX para búsquedas de ácidos nucleicos y búsquedas de aminoácidos traducidos en los 6 marcos de lectura abiertos, todos con parámetros por defecto convencionales, en la que la secuencia de consulta se filtra para detectar regiones de baja complejidad por defecto (descrito en Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402); (2) una alineación BLAST 2 (usando los parámetros descritos a continuación); (3) y/o PSI-BLAST con los parámetros por defecto convencionales (BLAST con iteraciones específicas de posición). Se observa que debido a algunas diferencias en los parámetros convencionales entre BLAST 2.0 Basic BLAST y BLAST 2, podría reconocerse que dos secuencias específicas tienen homología significativa usando el programa BLAST 2, mientras que una búsqueda realizada en BLAST 2.0 Basic BLAST usando una de las secuencias como secuencia de consulta puede no identificar la segunda secuencia en las coincidencias superiores. Además, PSI-BLAST proporciona una versión automatizada, fácil de usar, de una búsqueda de "perfil", que es un modo sensible de buscar homólogos de secuencia. El programa realiza en primer lugar una búsqueda en la base de datos BLAST con huecos. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineación significativa devuelta para construir una matriz de puntuación específica de posición, que reemplaza a la secuencia de consulta para la siguiente ronda de búsqueda en la base de datos. Por tanto, debe entenderse que el porcentaje de identidad puede determinarse usando uno cualquiera de estos programas.
- 25 Pueden alinearse dos secuencias específicas entre sí usando BLAST 2 Sequence tal como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequence - a new tool for comparing protein and nucleotide sequence", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250. La alineación de secuencias BLAST 2 se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda en BLAST con huecos (BLAST 2.0) entre las dos secuencias permitiendo la introducción de huecos (delecciones e inserciones) en la alineación resultante. Con fines de mayor claridad en el presente documento, se realiza una alineación de secuencias BLAST 2 usando los parámetros por defecto convencionales tal como sigue.

Para blastn, usando la matriz 0 BLOSUM62:

- 35 Recompensa por coincidencia = 1
- Penalización por coincidencia errónea = -2
- Penalizaciones por apertura de hueco (5) y extensión de extensión (2)
- 40 hueco x_dropoff (50) expectativa (10) tamaño de palabra (11) filtro (activado)

Para blastp, usando la matriz 0 BLOSUM62:

- 45 Penalizaciones por apertura de hueco (11) y extensión de hueco (1)
- hueco x_dropoff (50) expectativa (10) tamaño de palabra (3) filtro (activado).

- 50 En una realización de la presente invención, un dominio o proteína aislada de la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en cualquiera de la patente estadounidense 6.566.583; Metz *et al.*, *Science* 293:290-293 (2001); la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20040235127; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995; y la solicitud estadounidense provisional n.º 60/689.167, presentada el 10 de junio de 2005, o cualquier dominio o fragmento biológicamente activo del mismo.
- 55 Estas proteínas son proteínas del sistema de PKS de AGPI y pueden usarse conjuntamente con cualquiera de las proteínas auxiliares descritas en el presente documento.

- 60 En otra realización de la invención, una secuencia de aminoácidos que tiene la actividad biológica de una proteína descrita en el presente documento (por ejemplo, una proteína ACoAS) incluye una secuencia de aminoácidos que es lo suficientemente similar a la proteína o el polipéptido que se produce de manera natural que se describe específicamente en el presente documento como para que una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos pueda hibridarse en condiciones de rigurosidad moderada, alta o muy alta (descritas a continuación) a (es decir, con) una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína o el polipéptido que se produce de manera natural (es decir, al complemento de la hebra de ácido nucleico que codifica para la proteína o el polipéptido que se produce de manera natural). Preferiblemente, una secuencia de aminoácidos que tiene la actividad biológica de una proteína descrita en el presente documento está codificada por una secuencia de ácido

nucleico que se hibrida en condiciones de rigurosidad moderada, alta o muy alta al complemento de una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen métodos para deducir una secuencia complementaria. Debe observarse que puesto que las tecnologías de secuenciación de aminoácidos y de secuenciación de ácido nucleico no están completamente libres de errores, las secuencias presentadas en el presente documento, en el mejor de los casos, representan secuencias aparentes de las proteínas abarcadas por la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, las condiciones de hibridación se refieren a condiciones de hibridación convencionales en las que se usan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Tales condiciones convencionales se dan a conocer, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Además, se dan a conocer fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr una hibridación que permite grados variables de apareamiento erróneo de nucleótidos, por ejemplo, en Meinkoth *et al.*, 1984, Anal. Biochem. 138, 267-284.

Más particularmente, las condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad moderada, tal como se denominan en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que está usándose para estudiar con sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente el 30% o menos de apareamiento erróneo de nucleótidos). Las condiciones de hibridación y lavado de alta rigurosidad, tal como se denominan en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que está usándose para estudiar con sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente el 20% o menos de apareamiento erróneo de nucleótidos). Las condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad muy alta, tal como se denominan en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que está usándose para estudiar con sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente el 10% o menos de apareamiento erróneo de nucleótidos). Tal como se comentó anteriormente, un experto en la técnica puede usar las fórmulas en Meinkoth *et al.*, *ibidem*, para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr estos niveles particulares de apareamiento erróneo de nucleótidos. Tales condiciones variarán, dependiendo de si están formándose híbridos de ADN:ARN o ADN:ADN. Las temperaturas de fusión calculadas para híbridos de ADN:ADN son de 10°C, menores que para híbridos de ADN:ARN. En realizaciones particulares, las condiciones de hibridación rigurosas para híbridos de ADN:ADN incluyen hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC (Na⁺ 0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 35°C (rigurosidad inferior), más preferiblemente, entre aproximadamente 28°C y aproximadamente 40°C (más rigurosa) e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C (incluso más rigurosa), con condiciones de lavado apropiadas. En realizaciones particulares, las condiciones de hibridación rigurosas para híbridos de ADN:ARN incluyen hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC (Na⁺ 0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 45°C, más preferiblemente, entre aproximadamente 38°C y aproximadamente 50°C e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 45°C y aproximadamente 55°C, con condiciones de lavado rigurosas de manera similar. Estos valores se basan en cálculos de una temperatura de fusión para moléculas de más de aproximadamente 100 nucleótidos, formamida al 0% y un contenido en G + C de aproximadamente el 40%. Alternativamente, la T_m puede calcularse empíricamente tal como se expone en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, páginas 9.31 a 9.62. En general, las condiciones de lavado deben ser tan rigurosas como sea posible, y deben ser apropiadas para las condiciones de hibridación elegidas. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden incluir una combinación de condiciones de sal y temperatura que están aproximadamente 20-25°C por debajo de la T_m calculada de un híbrido particular, y las condiciones de lavado incluyen normalmente una combinación de condiciones de sal y temperatura que están aproximadamente 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación adecuadas para su uso con híbridos de ADN:ADN incluye una hibridación de 2-24 horas en 6X SSC (formamida al 50%) a aproximadamente 42°C, seguido por etapas de lavado que incluyen uno o más lavados a temperatura ambiente en aproximadamente 2X SSC, seguido por lavados adicionales a temperaturas superiores y fuerza iónica inferior (por ejemplo, al menos un lavado a aproximadamente 37°C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC, seguido por al menos un lavado a aproximadamente 68°C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC).

La presente invención también incluye una proteína de fusión que incluye cualquier proteína o cualquier homólogo o fragmento del mismo de la presente invención unido a uno o más segmentos de fusión. Los segmentos de fusión adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, segmentos que pueden: potenciar la estabilidad de una proteína; proporcionar otra actividad biológica deseable; y/o ayudar con la purificación de la proteína (por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad). Un segmento de fusión adecuado puede ser un dominio de cualquier tamaño que tenga la función deseada (por ejemplo, confiere estabilidad, solubilidad y actividad biológica aumentadas; y/o simplifica la purificación de una proteína). Los segmentos de fusión pueden unirse a extremos amino y/o carboxilo terminales de la proteína y pueden ser susceptibles de escisión con el fin de permitir la recuperación directa de la proteína deseada. Las proteínas de fusión se producen preferiblemente cultivando una célula recombinante transfectada con una molécula de ácido nucleico de fusión que codifica para una proteína incluyendo el segmento de fusión unido al extremo o bien carboxilo y/o bien amino terminal de la proteína de la

invención tal como se comentó anteriormente.

En una realización de la presente invención, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, así como homólogos de tales secuencias, pueden producirse con desde al menos uno, y hasta
 5 aproximadamente 20, aminoácidos heterólogos adicionales que flanquean cada uno del extremo C y/o N-terminal de la secuencia de aminoácidos dada. Puede hacerse referencia a la proteína o al polipéptido resultante como “que consiste esencialmente en” una secuencia de aminoácidos dada. Según la presente invención, los aminoácidos heterólogos son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran de manera natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de aminoácidos dada o que no se codificaría por los nucleótidos
 10 que flanquean la secuencia de ácido nucleico que se produce de manera natural que codifica para la secuencia de aminoácidos dada tal como se produce en el gen, si tales nucleótidos en la secuencia que se produce de manera natural se tradujesen mediante el uso de codones convencional para el organismo del que se deriva la secuencia de aminoácidos dada. De manera similar, la expresión “que consiste esencialmente en”, cuando se usa con referencia a una secuencia de ácido nucleico en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que
 15 codifica para una secuencia de aminoácidos dada que puede estar flanqueada por desde al menos uno, y hasta aproximadamente 60, nucleótidos heterólogos adicionales en cada uno del extremo 5' y/o el 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos dada. Los nucleótidos heterólogos no se encuentran de manera natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos dada tal como se produce en el gen natural.

El tamaño mínimo de una proteína o dominio y/o un homólogo o fragmento del mismo de la presente invención es, en un aspecto, un tamaño suficiente para tener la actividad biológica necesaria, o suficiente para servir como un antígeno para la generación de un anticuerpo o como una diana en un ensayo *in vitro*. En una realización, una proteína de la presente invención tiene al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud (por ejemplo, adecuada para un epítipo de anticuerpo o como un péptido detectable en un ensayo), o al menos aproximadamente
 25 25 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 350 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 450 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, etc., de cualquier longitud entre 8 aminoácidos y hasta la longitud completa de una proteína o dominio de la invención o más largo, en números enteros completos (por ejemplo, 8, 9, 10,...25, 26,...500, 501,...). No hay ningún límite, aparte de un límite práctico, en el tamaño máximo de una proteína de este tipo ya que la proteína puede incluir una parte de la proteína, el dominio o un fragmento biológicamente activo o útil de los mismos, o un dominio o proteína de longitud completa, más una secuencia adicional (por ejemplo, una secuencia de proteína de fusión), si se desea.

Otra realización de la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en secuencias de ácido nucleico que codifican para cualquiera de las
 40 proteínas o dominios descritos en el presente documento, incluyendo un homólogo o fragmento de cualquiera de tales proteínas, así como secuencias de ácido nucleico que son completamente complementarias a las mismas. Según la presente invención, una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Como tal, “aislado” no refleja necesariamente el grado en que se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen. Una molécula de ácido nucleico aislada que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye tal gen, sino que más bien incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales encontrados de
 50 manera natural en el mismo cromosoma, con la excepción de otros genes que codifican para otras proteínas del sistema de PKS de AGPI tal como se describe en el presente documento, cuando la molécula de ácido nucleico codifica para una proteína de PKS de AGPI central. Una molécula de ácido nucleico aislada también puede incluir una secuencia de ácido nucleico especificada flanqueada por (es decir, en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia) ácidos nucleicos adicionales que normalmente no flanquean la secuencia de ácido nucleico especificada en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula de ácido nucleico aislada puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados de o bien ADN o bien ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque el término “molécula de ácido nucleico” se refiere principalmente a la molécula de ácido nucleico física y el término “secuencia de ácido nucleico” se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, los dos términos pueden usarse de manera intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar para una proteína o un dominio de una proteína.

Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención se produce usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen moléculas de ácido nucleico naturales y homólogos de
 65 las mismas, incluyendo, pero sin limitarse a, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en las que se han insertado, delecionado, sustituido y/o invertido nucleótidos de tal manera que tales modificaciones

proporcionan el efecto deseado (por ejemplo, conservación, mejora o disminución de la actividad de la proteína). Se han comentado en detalle anteriormente homólogos de proteínas (por ejemplo, proteínas codificadas por homólogos de ácido nucleico).

- 5 Puede producirse un homólogo de molécula de ácido nucleico usando varios métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Por ejemplo, pueden modificarse moléculas de ácido nucleico usando una variedad de técnicas incluyendo, pero sin limitarse a, técnicas de mutagénesis clásicas y técnicas de ADN recombinante, tales como mutagénesis dirigida al sitio, tratamiento químico de una molécula de ácido nucleico para inducir mutaciones, escisión con enzimas de restricción de un fragmento de ácido nucleico, ligamiento de fragmentos de ácido nucleico, amplificación por PCR y/o mutagénesis de regiones seleccionadas de una secuencia de ácido nucleico, síntesis de mezclas de oligonucleótidos y ligamiento de grupos de mezclas para “construir” una mezcla de moléculas de ácido nucleico y combinaciones de las mismas. Pueden seleccionarse homólogos de moléculas de ácido nucleico a partir de una mezcla de ácidos nucleicos modificados examinando para seleccionar la función de la proteína codificada por el ácido nucleico y/o mediante hibridación con un gen de tipo natural.

El tamaño mínimo de una molécula de ácido nucleico de la presente invención es un tamaño suficiente para formar una sonda o cebador oligonucleotídico que puede formar un híbrido estable (por ejemplo, en condiciones de rigurosidad moderada, alta o muy alta) con la secuencia complementaria de una molécula de ácido nucleico de la presente invención, o de un tamaño suficiente para codificar para una secuencia de aminoácidos que tiene una actividad biológica de una proteína según la presente invención. Como tal, el tamaño de la molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de este tipo puede depender de la composición de ácido nucleico y el porcentaje de homología o identidad entre la molécula de ácido nucleico y la secuencia complementaria, así como de las condiciones de hibridación *per se* (por ejemplo, temperatura, concentración de sal y concentración de formamida). El tamaño mínimo de una molécula de ácido nucleico que se usa como cebador oligonucleotídico o como sonda es normalmente de al menos aproximadamente 12 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud si las moléculas de ácido nucleico son ricas en GC y de al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 18 bases de longitud si son ricas en AT. No hay ningún límite, aparte de un límite práctico, en el tamaño máximo de una molécula de ácido nucleico de la presente invención, ya que la molécula de ácido nucleico puede incluir una secuencia suficiente para codificar para un fragmento biológicamente activo de una proteína o la proteína de longitud completa.

Otra realización de la presente invención incluye una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un vector recombinante y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína o un péptido que tiene una actividad biológica de cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento. Tales secuencias de ácido nucleico se describieron en detalle anteriormente. Según la presente invención, un vector recombinante es una molécula de ácido nucleico diseñada por ingeniería genética (es decir, producida artificialmente) que se usa como herramienta para manipular una secuencia de ácido nucleico de elección y para introducir una secuencia de ácido nucleico de este tipo en una célula huésped. El vector recombinante es por tanto adecuado para su uso en clonación, secuenciación y/o manipulación de otra forma de la secuencia de ácido nucleico de elección, tal como expresando y/o suministrando la secuencia de ácido nucleico de elección a una célula huésped para formar una célula recombinante. Un vector de este tipo contiene normalmente secuencias de ácido nucleico heterólogas, es decir secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de manera natural adyacentes a una secuencia de ácido nucleico que va a clonarse o suministrarse, aunque el vector también puede contener secuencias de ácido nucleico reguladoras (por ejemplo, promotores, regiones no traducidas) que se encuentran de manera natural adyacentes a moléculas de ácido nucleico de la presente invención o que son útiles para la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (comentado en detalle a continuación). El vector puede ser o bien ARN o bien ADN, o bien procariota o bien eucariota, y normalmente es un plásmido. El vector puede mantenerse como un elemento extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o puede integrarse en el cromosoma de un organismo recombinante (por ejemplo, un microbio o una planta). Todo el vector puede permanecer en su lugar dentro de una célula huésped, o en determinadas condiciones, el ADN de plásmido puede delecionarse, dejando atrás la molécula de ácido nucleico de la presente invención. La molécula de ácido nucleico integrada puede estar bajo el control de un promotor cromosómico, bajo el control de un promotor de plásmido o nativo o bajo una combinación de varios controles de promotor. Pueden integrarse copias individuales o múltiples de la molécula de ácido nucleico en el cromosoma. Un vector recombinante de la presente invención puede contener al menos un marcador seleccionable.

En una realización, un vector recombinante usado en una molécula de ácido nucleico recombinante es un vector de expresión. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “vector de expresión” se usa para referirse a un vector que es adecuado para la producción de un producto codificado (por ejemplo, una proteína de interés). En esta realización, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el producto que va a producirse (por ejemplo, un dominio PKS de AGPI) se inserta en el vector recombinante para producir una molécula de ácido nucleico recombinante. La secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína que va a producirse se inserta en el vector de una manera que une operativamente la secuencia de ácido nucleico a secuencias reguladoras en el vector que permiten la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico dentro de la célula huésped recombinante.

En otra realización, un vector recombinante usado en una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente

invención es un vector de direccionamiento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “vector de direccionamiento” se usa para referirse a un vector que se usa para suministrar una molécula de ácido nucleico particular a una célula huésped recombinante, en el que la molécula de ácido nucleico se usa para deleccionar, inactivar o reemplazar un gen endógeno o parte de un gen dentro del microorganismo o la célula huésped (es decir, se usa para la alteración genética dirigida o tecnología de inactivación). Un vector de este tipo también puede conocerse en la técnica como vector de “inactivación”. En un aspecto de esta realización, una porción del vector, pero más normalmente, la molécula de ácido nucleico insertada en el vector (es decir, el inserto), tiene una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una secuencia de ácido nucleico de un gen diana en la célula huésped (es decir, un gen que se selecciona como diana para deleccionarse o inactivarse). La secuencia de ácido nucleico del inserto del vector está diseñada para asociarse con el gen diana de manera que el gen diana y el inserto experimentan recombinación homóloga, mediante lo cual el gen diana endógeno se delecciona, se inactiva, se atenúa (es decir, mediante al menos una parte del gen diana endógeno que está mutándose o deleccionándose), o se reemplaza. El uso de este tipo de vector recombinante para reemplazar un gen de *Schizochytrium* endógeno, por ejemplo, por un gen recombinante que se ha descrito anteriormente por los presentes inventores, y la técnica general para la transformación genética de traustozoides se describe en detalle en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 10/124.807, publicada como publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030166207, publicada el 4 de septiembre de 2003. Se conocen bien en la técnica técnicas de transformación genética.

Normalmente, una molécula de ácido nucleico recombinante incluye al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención operativamente unida a una o más secuencias de control de la expresión. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “molécula recombinante” o “molécula de ácido nucleico recombinante” se refiere principalmente a una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico operativamente unida a una secuencia de control de la transcripción, pero puede usarse de manera intercambiable con la expresión “molécula de ácido nucleico”, cuando tal molécula de ácido nucleico es una molécula recombinante tal como se comenta en el presente documento. Según la presente invención, la expresión “operativamente unida” se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, una secuencia de control de la transcripción y/o una secuencia de control de la traducción) de una manera tal que la molécula puede expresarse cuando se transfecta (es decir, se transforma, se transduce, se transfecta, se conjuga o se conduce) al interior de una célula huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan la iniciación, la elongación o la terminación de la transcripción. Secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son las que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en una célula o un organismo huésped en el que va a introducirse la molécula de ácido nucleico recombinante.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes de la presente invención también pueden contener secuencias reguladoras adicionales, tales como secuencias reguladoras de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante. En una realización, una molécula recombinante de la presente invención, incluyendo las que se integran en el cromosoma de la célula huésped, también contiene señales secretoras (es decir, secuencias de ácido nucleico de segmento señal) para permitir que una proteína expresada se secrete de la célula que produce la proteína. Los segmentos señal adecuados incluyen un segmento señal que está asociado de manera natural con la proteína que va a expresarse o cualquier segmento señal heterólogo que pueda dirigir la secreción de la proteína según la presente invención. En otra realización, una molécula recombinante de la presente invención comprende una secuencia líder para permitir que una proteína expresada se suministre a, y se inserte en, la membrana de una célula huésped. Las secuencias líder adecuadas incluyen una secuencia líder que está asociada de manera natural con la proteína, o cualquier secuencia líder heteróloga que pueda dirigir el suministro y la inserción de la proteína en la membrana de una célula.

Pueden usarse una o más moléculas recombinantes de la presente invención para producir un producto codificado (por ejemplo, una ACoAS) de la presente invención. En una realización, se produce un producto codificado expresando una molécula de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento en condiciones eficaces para producir la proteína. Un método preferido para producir una proteína codificada es transfectando una célula huésped con una o más moléculas recombinantes para formar una célula recombinante. Las células huésped adecuadas para transfectar incluyen, pero no se limitan a, cualquier célula bacteriana, fúngica (por ejemplo, levadura), de protista, de microalgas, de algas, de insecto, vegetal o animal que pueda transfectarse. En una realización de la invención, una célula huésped preferida es una célula huésped vegetal. Las células huésped pueden ser o bien células no transfectadas o bien células que ya están transfectadas con al menos otra molécula de ácido nucleico recombinante.

Según la presente invención, el término “transfección” se usa para referirse a cualquier método mediante el cual puede insertarse una molécula de ácido nucleico exógeno (es decir, una molécula de ácido nucleico recombinante) en una célula. El término “transformación” puede usarse de manera intercambiable con el término “transfección” cuando tal término se usa para referirse a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como algas, bacterias y levadura, o en células de plantas. En sistemas microbianos y de plantas, el término “transformación” se usa para describir un cambio heredado debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo o la planta y es esencialmente sinónimo al término “transfección.” Sin embargo, en células

animales, transformación ha adquirido un segundo significado que puede referirse a cambios en las propiedades de crecimiento de células en cultivo tras volverse cancerosas, por ejemplo. Por tanto, para evitar la confusión, el término “transfección” se usa preferiblemente con respecto a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en células animales, y el término “transfección” se usará en el presente documento para abarcar generalmente la transfección de células animales, y la transformación de células microbianas o células de plantas, en la medida en que los términos se refieran a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en una célula. Por tanto, las técnicas de transfección incluyen, pero no se limitan a, transformación, bombardeo con partículas, difusión, transporte activo, sonicación en baño, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

Un experto en la técnica apreciará que el uso de tecnologías de ADN recombinante puede mejorar el control de la expresión de moléculas de ácido nucleico transfectadas manipulando, por ejemplo, el número de copias de las moléculas de ácido nucleico dentro de la célula huésped, la eficacia con la que se transcriben esas moléculas de ácido nucleico, la eficacia con la que se traducen los transcritos resultantes y la eficacia de las modificaciones postraduccionales. Adicionalmente, la secuencia promotora puede modificarse por ingeniería genética para mejorar el nivel de expresión en comparación con el promotor nativo. Las técnicas recombinantes útiles para controlar la expresión de moléculas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, integración de las moléculas de ácido nucleico en uno o más cromosomas de la célula huésped, adición de secuencias de estabilidad de vector a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación de moléculas de ácido nucleico para que se correspondan con el uso de codones de la célula huésped y delección de secuencias que desestabilizan los transcritos.

Muchas modificaciones genéticas útiles para producir moléculas bioactivas resultarán evidentes para los expertos en la técnica, dada la presente divulgación, y otras diversas modificaciones se han comentado anteriormente en el presente documento. La presente invención contempla cualquier modificación genética relacionada con un sistema de PKS de AGPI y/o proteína auxiliar tal como se describe en el presente documento que dé como resultado la producción de una molécula bioactiva deseada.

Las moléculas bioactivas, según la presente invención, incluyen cualquier molécula (compuesto, producto, etc.) que tenga una actividad biológica, y que pueda producirse por un sistema de PKS de AGPI. Tales moléculas bioactivas pueden incluir, pero no se limitan a: un ácido graso poliinsaturado (AGPI), una formulación antiinflamatoria, un agente quimioterápico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco anti-*Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico y una formulación hipocolesterolemiante. Una ventaja del sistema de PKS de AGPI de la presente invención es la capacidad de un sistema de este tipo para introducir dobles enlaces carbono-carbono en la configuración *cis*, y moléculas que incluyen un doble enlace en cada tercer carbono. Esta capacidad puede utilizarse para producir una variedad de compuestos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para el fin de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Introducción general a los ejemplos. Se han identificado genes que codifican para AGPI sintasas en bacterias marinas y en especies de traustequitridio. Varios de estos conjuntos de genes se han expresado en *E. coli* y, cuando se suministran con una PPTasa adecuada, los productos de AGPI particulares de esas enzimas pueden acumularse en esas células. Sin embargo, según el entender de los presentes inventores, el método de liberación de los AGPI de estas enzimas no se ha descrito previamente. El mecanismo de liberación tiene implicaciones relacionadas con la expresión de sistemas de AGPI sintasa en organismos huésped heterólogos. También puede proporcionarse una orientación a los esfuerzos dirigidos a modular el flujo de carbono a través de ese sistema y la cantidad final de AGPI que se acumula en organismos huésped heterólogos o nativos. En el presente documento, los presentes inventores muestran que los productos de la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (y, sin querer restringirse a la teoría, posiblemente todos los sistemas de AGPI eucariotas, incluyendo todos los sistemas de PKS de AGPI de traustequitridio) son ácidos grasos libres, y que la liberación del ácido graso libre es integral para el propio complejo enzimático. Además, en *Schizochytrium*, el AGL de AGPI se esterifica a CoA antes de entrar en los fosfolípidos (PL) y triacilgliceroles (TAG). Los datos descritos en los ejemplos a continuación indican estrategias para la expresión en organismos huésped heterólogos así como para la modificación de acumulación de AGPI en organismos huésped nativos.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la creación de una cepa con FAS desactivada de *Schizochytrium* para estudios bioquímicos.

Schizochytrium contiene un único gen grande que codifica para la enzima FAS responsable de la producción de

ácidos grasos saturados de cadena corta (descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050191679 A1). Se obtuvo un constructo con FAS desactivada de *Schizochytrium* (deficiente en FAS) usando procedimientos descritos en la patente estadounidense n.º 7.001.772. Se clonó un fragmento de EcoRV de ~10,0 kB de ADN genómico que contenía la mayor parte del Orf de FAS (desde aproximadamente 728 pb en el sentido de 3' del supuesto codón de iniciación ATG hasta aproximadamente 680 pb en el sentido de 3' del codón de terminación) en un vector Bluescript de Stratagene (pBSK) en el sitio de EcoRV de la región de clonación múltiple. Se eliminó un fragmento BglIII interno de ~3,5 kB del ADN de *Schizochytrium* clonado y se substituyó por un fragmento BamHI de ~1,1 kB de pTubZeo11-2 que contenían una casete de resistencia a zeocina (véase la patente estadounidense n.º 7.001.772, citada anteriormente). Se introdujo el plásmido (pJK878) en una cepa defectuosa en la pared celular de *Schizochytrium* (denominada Ac66) a través de bombardeo de partículas. Se seleccionaron inicialmente los transformantes sembrando en placa en medios que contenían zeocina y complementados con ácido palmítico. Se usó una selección secundaria, falta de crecimiento en placas no complementadas con ácido palmítico, para identificar posibles acontecimientos de cruzamiento doble en los que una parte de la región genómica de FAS se había substituido por el casete resistente a zeocina. Se usaron análisis de PCR y transferencia de tipo Southern para confirmar que uno de los transformantes (marcado deficiente en FAS) tenía la estructura genómica prevista. Se mantuvo esta cepa haciéndola crecer en medios complementados con ácido palmítico 500 µM. Se empleó una estrategia similar, es decir inserción de un casete de resistencia a zeocina en uno de los genes que codifican para una subunidad de la AGPI sintasa de *Schizochytrium*, para inactivar esa enzima en la cepa de *Schizochytrium* Ac66. En este caso, el medio se complementa DHA 500 µM. Se usaron células completas y extractos libres de células de estas cepas en estudios bioquímicos posteriores (véanse los ejemplos a continuación).

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo describe el protocolo general para la preparación de extractos libres de células de *Schizochytrium* Ac66, y las cepas deficientes en AGPI sintasa y deficientes en FAS derivadas de *Schizochytrium* Ac66.

Un ejemplo de un protocolo para la preparación de homogeneizados libres de células (CFH) a partir de cepas deficientes en pared celular de *Schizochytrium* es tal como sigue. Se hicieron crecer células en medio A50-3 y entonces se diluyeron en medio M2B. Se complementaron los medios usados para hacer crecer las cepas deficientes con el ácido graso apropiado. Se hicieron crecer células hasta una DO 600 nm > ~2,5 y < ~5 en los medios M2B. Se recogieron las células en 50 ml de medio de cultivo mediante centrifugación (centrífuga de sobremesa ~1200 rpm x 4 minutos) en tubos de plástico de 50 ml. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml de tampón A (fosfato 100 mM, pH 7,2, glicerol al 10% (p/v), EDTA 1 mM y DTT 2 mM) y se centrifugaron como anteriormente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml de tapón A enfriado en hielo. Se sonicó la suspensión (procesador ultrasónico modelo GE130 con micropunta, generador de impulsos a 2 segundos, ajuste de potencia a ~1 vatio) con un tubo en hielo durante 1,5 minutos. Se comprobó la muestra mediante microscopía para garantizar que todas las células estaban rotas. Se añadieron alícuotas de CFH en porciones de 200 µl en tubos de PCR de 0,5 ml con tapones y se congelaron dejando caer gotas en N₂ líquido. Se almacenaron las muestras a -74°C hasta que se necesitaron.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe las condiciones generales para ensayos *in vitro* de actividad FAS y AGPI sintasa.

Un ejemplo de un protocolo para ensayos de actividad *in vitro* de las actividades tanto FAS como AGPI es tal como sigue. En un volumen final de 100 µl, se mezclan la preparación enzimática y el tampón A (volumen de estos 2 componentes = 90 µl) más los siguientes componentes añadidos como un cóctel (en 10 µl) para producir las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: malonil-CoA (50 µM - una mezcla de frío y malonil-2-¹⁴C-CoA de manera que la concentración final del radiomarcador es de 0,65 µCi/ml), NADH (1 mM), NADPH (1 mM) y acetil-CoA (10 µM). Estos componentes y componentes adicionales pueden ajustarse dependiendo de los requisitos de los experimentos particulares. Las reacciones de ensayo se llevan a cabo en tubos de vidrio en un baño de agua a temperatura ambiente (~21°C). El tiempo de incubación depende de los requisitos experimentales. Se detienen las reacciones mediante uno de dos métodos dependiendo del protocolo de desarrollo. Para la conversión de ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) usando un método ácido, se detiene la reacción añadiendo el reactivo de EMAG (véase a continuación). Para la extracción de lípidos sin derivatización, se detiene la reacción mediante la adición de 125 µl de isopropanol:ácido acético (4:1 v/v) (véase a continuación).

Protocolo de EMAG ácido: Se detiene la reacción mediante la adición de 2,0 ml de HCl al 4% en metanol más 50 µl de tolueno, se sellan los tubos de vidrio con tapones revestidos con teflón y se calientan a 100°C durante 1 h. Se enfría hasta temperatura ambiente, se añaden 1,0 ml de hexano y 0,5 ml de agua, se agita con vórtex, luego se deja que se separen. Si se desea, se retira una porción para recuento por centelleo líquido (LSC). Se transfieren ~600 µl de la fase orgánica a un nuevo tubo y se elimina el disolvente bajo N₂. Se disuelve el residuo en 50 µl de hexano y se coloca o bien sobre placas de CCF de gel de sílice, 60 A (se revela con hexano:dietil éter:ácido acético - 70:30:2) o bien sobre placas de gel de sílice G sumergidas en un 10% de AgNO₃/un 90% de acetonitrilo (activadas durante

30 min a 100°C antes de su uso) (se revela con hexano:dietil éter/ ácido acético - 70:20:2). Se deja que las placas se sequen al aire y se detectan las zonas radiactivas usando tecnología de detección y cuantificación de la radiactividad.

- 5 *Protocolo de HIP - extracción de lípidos no derivatizados:* Tal como se indicó anteriormente, se detiene la reacción mediante la adición de 125 ul de isopropanol:ácido acético (4:1 v/v), entonces se añaden 2 ml de hexano:isopropanol (3:2, v/v), se agita con vórtex, luego se añade 1 ml de sulfato de sodio al 6,7% (p/v) y se agita con vórtex de nuevo. Se deja que se separen las fases. Si se desea, se retira una porción de la fase orgánica (parte superior) para LSC, luego se transfiere el resto (~1,0 ml) a un tubo nuevo. Se elimina el disolvente con gas N₂ y se disuelve el residuo en 50 ul de hexano. Se coloca la muestra sobre una placa de CCF de gel de sílice, 60 A y se revela con hexano:dietil éter:ácido acético (70:30:2). Se deja que la placa se seque al aire y se detectan las zonas radiactivas usando tecnología de detección y cuantificación de la radiactividad.

Ejemplo 4

- 15 El siguiente ejemplo describe los resultados de ensayos *in vitro* de actividades FAS y AGPI sintasa.

Se prepararon CFH de *Schizochytrium* Ac66 y las cepas deficientes en AGPI sintasa y deficientes en FAS derivadas de *Schizochytrium* Ac66 y se sometieron a ensayo para determinar las actividades FAS y AGPI sintasa tal como se describió anteriormente usando los protocolos de EMAG ácido y CCF con plata. La figura 1 muestra los resultados de esos ensayos. Las bandas marcadas en la imagen de la placa de CCF representan la radioactividad incorporada en EMAG (verificado mediante migración conjunta con patrones así como mediante separaciones de HPLC). Los carriles 1 y 2 muestran los perfiles obtenidos usando extractos de la cepa original Ac66. En estos carriles pueden observarse los productos tanto de la FAS (EMAG 14:0 y 16:0) como de la AGPI sintasa (DHA y DPA n-6). En los carriles 3 y 4 se muestran los perfiles obtenidos cuando se ha inactivado la enzima AGPI sintasa. En este caso, no están presentes DHA ni DPA n-6. En los carriles 5 y 6 se muestran los perfiles obtenidos cuando se inactiva la FAS. En este caso, desaparecen los ácidos grasos derivados de la FAS, es decir 14:0 y 16:0 y derivados de estos ácidos grasos. Los datos indican que la actividad FAS ha resultado afectada grave o completamente en esta cepa deficiente en FAS. Se usó la cepa deficiente en FAS para una caracterización adicional de la síntesis de AGPI en *Schizochytrium* y la ruta de acumulación.

Ejemplo 5

- 35 El siguiente ejemplo describe la caracterización adicional de la síntesis de AGPI en *Schizochytrium* y proporciona evidencia de que el producto inicial de la AGPI sintasa de *Schizochytrium* es un ácido graso libre (AGL).

La conversión de productos de reacción de ensayo *in vitro* en EMAG usando el método ácido es útil para determinar la incorporación de radioactividad a partir de malonil-CoA en restos de ácido graso, pero no muestra la forma molecular de estos ácidos grasos antes de esa derivatización. La figura 2 muestra los resultados de un transcurso de tiempo en un ensayo *in vitro* de la cepa deficiente en FAS en la que se extrajeron los lípidos usando el protocolo de HIP descrito anteriormente (es decir, sin conversión de restos de acilo graso en ésteres metílicos) y luego se separaron usando CCF de fase normal. Las posiciones en la placa en la que migran los patrones de TAG y ácido graso libre (AGL) se indican a la izquierda. En este sistema de CCF, no se separan bien AGL de diferentes longitudes de cadena y grados de insaturación. Sin embargo, puesto que la cepa utilizada tiene poca o ninguna actividad FAS, es probable que los AGL en esta zona se deriven del sistema de AGPI sintasa. En la figura 3 se muestra una evidencia adicional que apoya esto. En este caso se muestra que el aspecto del radiomarcador en la banda de AGL durante el ensayo *in vitro* depende de la adición de NADPH. En cambio, el NADH no soporta la reacción. Esta dependencia estricta de NADPH como reductor también es una característica de la AGPI sintasa derivada de *Shewanella* SCRC2738 (figura 2C de Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001)). En ambas figuras 2 y 3, es evidente una banda radiomarcada que migra ligeramente más rápido que la banda de AGL (marcada como "desconocida"). Puesto que el aspecto de la banda es independiente de la adición de reductor (NADH o NADPH – véase el carril 5, figura 3), no es probable que esté asociada con la actividad AGPI sintasa. Adicionalmente, esta banda puede detectarse durante un análisis similar de cepas en el que se ha inactivado la AGPI sintasa (datos no mostrados). Los datos en las figuras 2 y 3 sugieren que el producto inicial de la AGPI sintasa de *Schizochytrium* es un AGL. En sistemas de FAS que liberan sus productos como AGL (tales como FAS de mamífero), esos AGL se esterifican entonces a CoA antes de entrar en PL o TAG. La activación del AGL se lleva a cabo mediante acil-CoA sintetasa en una reacción que requiere ATP y Mg⁺². La aparición de algo de radiactividad en una fracción de TAG de manera tardía en un transcurso de tiempo de la reacción *in vitro* concuerda con una ruta de este tipo en *Schizochytrium* (debido al ATP residual en la muestra). Este concepto se sometió a prueba adicionalmente (véase a continuación).

Ejemplo 6

- 65 El siguiente ejemplo proporciona una evidencia en apoyo de la implicación de la reacción de acil-CoA sintetasa en la ruta de acumulación de AGPI de *Schizochytrium*.

En la figura 4 se muestran los efectos de la adición de ATP (2,5 mM) y Mg⁺² (10 mM) sobre los productos de ensayo *in vitro* en muestras de *Schizochytrium* deficientes en FAS. Se incubaron las muestras en la mezcla de reacción patrón durante 10 minutos y luego se añadieron ATP y Mg⁺². Se detuvieron las reacciones a diversos puntos de tiempo tras la adición de ATP y Mg⁺² (es decir, 0 = sin adición, 10 y 30 s, y 1, 3, 10 y 30 min). Puede observarse que el radiomarcador asociado con la banda de AGL disminuye y el radiomarcador asociado con la banda de TAG aumenta durante el transcurso de tiempo. El radiomarcador asociado con la banda marcada "Desconocida" no se ve afectado por la adición de ATP. Estos datos concuerdan con la implicación de una reacción que requiere ATP para la migración de AGL marcado a la fracción de TAG.

Se ha caracterizado la triacsina C como un inhibidor específico de acil-CoA sintetetas que activan AGPI de cadena larga (Knoll *et al.*, 1995). Se sometieron a prueba los efectos de la triacsina C sobre el perfil de producto durante los ensayos *in vitro* de muestras de cepas deficientes en FAS. Se incubó la muestra en el cóctel patrón que contenía diversas concentraciones de triacsina C (0, 25, 100 ó 200 µM) durante 10 minutos y luego se añadieron ATP y Mg⁺². Se dejó que la reacción continuara durante 20 minutos adicionales y luego se detuvo y se extrajeron los lípidos y se separaron mediante CCF usando el protocolo de HIP. Los resultados se muestran en la figura 5. La adición de la triacsina C a concentraciones superiores bloqueó la pérdida del radiomarcador de la banda de AGL. Estos resultados concuerdan con la implicación de una acil-CoA sintetasa en la ruta.

Ejemplo 7

El siguiente ejemplo describe ensayos *in vitro* de extractos de *E. coli* que expresan Orf A, OrfBss (OrfB*), OrfC de *Schizochytrium* y HetI de Nostoc.

Los datos mostrados en los ejemplos anteriores indican que los AGPI en *Schizochytrium* se convierten en la forma de ácido graso antes de entrar en TAG y PL. En el presente documento se presentan los datos que indican que la liberación del AGPI como ácido graso libre es una parte integral de la enzima AGPI sintasa. Se clonaron el Orf A nativo (secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 1), OrfBss (también denominado OrfB*; secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 37) y OrfC nativo (secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 5) de *Schizochytrium* como un operón artificial en un vector pET y se expresaron en *E. coli* tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100995, citada anteriormente. Se clonó HetI en un vector basado en pACYC y se expresó en esas mismas células. Se hicieron crecer las células hasta una D.O. de ~1 y se añadió IPTG (concentración final de 1 mM) para inducir la producción de la polimerasa de T7. Aproximadamente 4 horas tras la inducción, se recogieron las células, se lavaron con tampón A y se rompieron mediante dos pases a través de una célula de presión francesa. Se apartaron alícuotas del homogeneizado y se centrifugó el resto (5 k x g x 5 min) para producir el sobrenadante 1 (S1). De nuevo, se apartaron alícuotas y se centrifugó el resto del material a 100.000 x g durante 1 hora para producir fracciones de sedimento a alta velocidad (P2) y sobrenadante a alta velocidad (S2). Se resuspendió la fracción de sedimento en tampón A hasta el volumen colocado originalmente en el tubo de centrifuga. Se sometieron a ensayo todas estas fracciones usando los métodos generales descritos anteriormente usando el desarrollo de EMAG ácido/CCF en fase de plata o la extracción con HIP de lípidos seguido por separación en CCF de fase normal. La figura 6 muestra los resultados de esos ensayos.

El análisis con EMAG ácido (figura 6A) muestra que los productos primarios del ensayo *in vitro* son DHA y DPA n-6. La fracción con la mayor actividad es el homogeneizado con mucha menos actividad en las fracciones S1 y P2. Se detectó muy poca actividad en la fracción S2. Es de interés en este caso que incluso en las fracciones de CFH y S1, pudo detectarse muy poca evidencia de los productos del sistema de FAS (indicado por la flecha marcada como 16:0 en la figura 6A). Esto se debe probablemente a los altos niveles de expresión de los componentes de la enzima AGPI cuando se usa el sistema de T7. En cambio, cuando se realizaron ensayos similares en extractos (CFH y S1) de *E. coli* que contenían un cósmido que codifica para una EPA sintasa de *Shewanella*, la mayoría de la radioactividad en la placa de CCF estaba asociada con productos de FAS (Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001), figura 2B). Además, el sistema de FAS de *E. coli* endógeno está compuesto por varias proteínas solubles individuales y la actividad FAS permanece en la fracción de sobrenadante tras la centrifugación a alta velocidad (Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001), figura 2B). En cambio, la actividad AGPI sintasa mostrada en la figura 6A se reparte en la fracción de sedimento tras la centrifugación a alta velocidad.

Los datos en la figura 6B muestran los resultados de ensayos de muestras de la misma cepa de *E. coli* usada para la figura 6A, excepto porque los productos lipídicos se extrajeron simplemente con HIP (en lugar de convertirse en EMAG) antes de la separación mediante CCF. Se usaron dos fracciones, CFH (lado izquierdo de la figura) y P2 (en el lado derecho). Las cantidades de los extractos usados en los ensayos se ajustaron de modo que se incorporaron cantidades aproximadamente iguales de radioactividad en los lípidos en los dos casos. También se muestran los resultados en los que se varió el componente reductor (NADH y/o NADPH) del cóctel de ensayo tal como sigue: carril 1 – sólo NADPH, carril 2 – sólo NADPH, carril 3 – tanto NADH como NADPH y carril 4 – se añadió agua en lugar de disoluciones madre que contenía cualquier componente. Los datos en la figura 6B muestran que la mayor parte del radiomarcador que se mueve en la placa de CCF migra conjuntamente con patrones de ácido graso libre. Además, la aparición de la banda principal (AGL) depende de la adición de NADPH al cóctel de ensayo. El requisito de NADPH y la falta de actividad FAS significativa en estas fracciones (especialmente en la fracción P2) indican que el AGL es el producto de la enzima AGPI sintasa. Puesto que sólo se expresaron tres genes de *Schizochytrium* (que

codifican para los Orf A, B y C) en esta cepa de *E. coli* (junto con HetI), los datos indican que la liberación del AGPI de la sintasa es una propiedad inherente de esa enzima y no se debe a una enzima tioesterasa separada.

Una variedad de datos, aspectos importantes de los cuales se han presentado en los ejemplos anteriores, indican las siguientes características de la síntesis y acumulación de AGPI en *Schizochytrium*. La AGPI sintasa responsable tanto de DPAn-6 como de DHA está codificada por los Orf A, B y C tal como se describe en la patente estadounidense 6.566.583, Metz *et al.*, Science 293:290-293 (2001), la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020194641 y la publicación PCT n.º WO 2006/135866. Los dominios ACP de la subunidad A se activan mediante una PPTasa endógena. La reacción de síntesis usa malonil-CoA como fuente de carbono (también puede requerirse o no acetyl-CoA) y NADPH como reductor. Los productos de AGPI se liberan de la enzima como AGL y esta liberación es una característica inherente de la propia enzima. Los AGL se esterifican para dar CoA en una reacción dependiente de ATP catalizada por una o más acil-CoA endógenas. Los AGPI-CoA sirven entonces como sustratos para las enzimas de síntesis de PL y TAG.

15 Ejemplo 8

El siguiente ejemplo muestra la expresión de genes que codifican para la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (sOrfA, sOrfB y OrfC nativo, véase a continuación) junto con HetI en levaduras de panadería.

20 Se expresaron HetI y genes de AGPI sintasa de *Schizochytrium* en levaduras usando materiales obtenidos de Invitrogen. Se usó la cepa INVsc1 de *Saccharomyces cerevisiae* junto con los siguientes vectores de transformación: pYESLeu (sOrfA, SEQ ID NO: 35, que codifica para SEQ ID NO: 2), pYES3/CT (sOrfB, SEQ ID NO: 36, que codifica para SEQ ID NO: 4), pYES2/CT (OrfC, SEQ ID NO: 5, que codifica para SEQ ID NO: 6) y pYESHis (HetI, SEQ ID NO: 33, que codifica para SEQ ID NO: 34). Se modificaron algunos de los vectores para adaptarse a requisitos de clonación específicos. Se usaron medios de selección apropiados, dependiendo del experimento particular. Se clonaron los genes, en cada caso, detrás de un promotor GAL1 y se indujo la expresión mediante resuspensión de células lavadas en medios que contenían galactosa según las directrices proporcionadas por Invitrogen. Se hicieron crecer las células a 30°C y se recogieron (mediante centrifugación) a los tiempos indicados tras haberse transferido al medio de inducción. Se secaron por congelación los sedimentos celulares y se prepararon EMAG usando metanol ácido, se extrajeron en hexano y se analizaron mediante CG.

Los experimentos preliminares indicaron que la expresión de la forma nativa de OrfA (SEQ ID NO: 1) y la forma nativa ligeramente modificada de OrfB (OrfB*, SEQ ID NO: 37) en levaduras no dio como resultado la producción de proteínas del tamaño esperado (tampoco se detectaron ARNm correctos). En cambio, se detectó una proteína del tamaño esperado en una célula en la que se expresaba la forma nativa de OrfC (SEQ ID NO: 5). Volvieron a sintetizarse los genes que codifican para los Orf A y B de modo que su uso de codones estaba más en línea con los tolerados por levaduras (la nueva síntesis se realizó por Blue Heron, Inc.). Estos genes sintéticos se indican en el presente documento como sOrfA (SEQ ID NO: 35) y sOrfB (SEQ ID NO: 36). La expresión de estos genes en levaduras dio como resultado la acumulación de proteínas correspondientes a los tamaños esperados de Orf A y B, respectivamente.

La figura 7 muestra una comparación del perfil de ácidos grasos de células de levadura que expresan el sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* (sOrfA, sOrfB, OrfC y HetI) y uno obtenido a partir de células control (que carecían del gen de sOrfA). Se recogieron células ~20 h tras la inducción. Puede observarse que aparecieron dos picos de EMAG novedosos en el perfil de la cepa que expresaba el sistema de AGPI sintasa completo. Estos dos picos se identificaron como DPA n-6 y DHA mediante comparación del tiempo de elución con patrones auténticos y posteriormente mediante análisis de EM. Tal como se predijo a partir de la caracterización de los inventores de la AGPI sintasa de *Schizochytrium*, aparte de DHA y DPA n-6, no resulta evidente ningún otro pico novedoso en el perfil.

La figura 8 muestra la región del cromatograma de CG de la figura 7, que contiene los EMAG de AGPI. Tanto las células control como las células que expresan la AGPI sintasa contienen un pico que eluye cerca del EMAG de DHA. Esto se ha identificado como EMAG C26:0 y (basándose en referencias bibliográficas) se deriva de esfingolípidos. Aunque eluye cerca del pico de DHA, la resolución es suficiente para que no interfiera con la cuantificación de DHA. El pico de DPAn-6 está bien separado de otros lípidos de levadura endógenos en el perfil de EMAG. En este ejemplo particular, las células que expresaban el sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* acumularon el 2,4% de DHA y el 2,0% de DPAn-6 (como porcentaje de los EMAG totales). La suma de DHA y DPAn-6 es del 4,4% de los ácidos grasos medidos en las células. La razón de DHA con respecto a DPAn-6 observada en las células fue de ~1,2:1.

Los resultados presentados anteriormente que muestran la expresión de la AGPI sintasa *Schizochytrium* en levadura proporcionan una confirmación de la ruta propuesta en las solicitudes anteriores así como de las predicciones en cuanto a las alteraciones de los perfiles de ácidos grasos que pueden esperarse en levadura y también en plantas.

65 Ejemplo 9

El siguiente ejemplo describe el aumento de la acumulación de AGPI en levaduras que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* mediante la coexpresión de acil-CoA sintetasas específicas.

5 Los inventores han demostrado que, en *Schizochytrium*, los productos de AGL de su AGPI sintasa se convierten de manera eficaz en acil-CoA mediante acil-CoA sintetasas (ACoAS) endógenas (véanse los ejemplos anteriores). Mediante el examen de una base de datos de EST, los inventores identificaron 9 supuestas ACoAS que pueden estar implicadas en la conversión de los AGPI en los acil-CoA correspondientes.

10 En resumen, los presentes inventores han examinado una base de datos de EST de *Schizochytrium* que consiste en secuencias obtenidas de ~20.000 plásmidos aislados de colonias seleccionadas de diversas bibliotecas de ADNc para esos EST que muestran homología con proteínas con actividades ACoAS conocidas (o sospechadas). Los inventores usaron el programa VectorNTI, Contig Express, para ensamblar éstos en cóntigos (cuando estaban disponibles dos o más secuencias solapantes) y los editaron basándose en la calidad de la información de secuencia individual. Los resultados de este esfuerzo se resumen a continuación. Se identificaron ocho cóntigos diferentes y un singlete (secuencias no solapantes en la base de datos) que eran candidatos para asociarse con enzimas ACoAS que pueden convertir eficazmente el producto de la AGPI sintasa en el acil-CoA correspondiente. Usando los datos de EST expuestos como guía, se obtuvieron las secuencias de regiones codificantes completas para cada candidato y se verificaron usando diversos métodos convencionales (por ejemplo, secuenciación de subclones de ADN genómico y productos de PCR derivados de ADN genómico).

20 Secuencias codificantes de Acil-CoA sintetasa (ACS) de *Schizochytrium* y traducciones deducidas:

1. Longitud = 2004 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) (SEQ ID NO: 82). Se predice que codifica para una proteína de 668 aminoácidos (SEQ ID NO: 83), 73,5 kDa. La secuencia de la proteína tiene buena homología con ACS conocidas. La mejor coincidencia en Blast es con una ACS de *Thalassiosira pseudonanna* (TplacA, número de registro: AAW58006) que se ha caracterizado y se ha mostrado que tiene alta actividad con DHA (Tonon *et al.*, Plant Physiol. Mayo de 2005; 138(1):402-8). Los tres aminoácidos del extremo C-terminal de SEQ ID NO: 83 son: SKL - un motivo asociado con el direccionamiento de proteínas al peroxisoma. Este motivo C-terminal también está presente en la ACS de *Thalassiosira pseudonanna* mencionada anteriormente.

30 2. ScACS-2 (también denominada ScACoAS-2 o ACS-2): Longitud = 2340 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 84). Se predice que codifica para una proteína de 780 aminoácidos (SEQ ID NO: 85), 84,7 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la supuesta proteína con ACS conocidas incluyendo los ejemplos humanos, *Lipidosin* y *Bubble Gum*.

35 3. ScACS-3 (también denominada ScACoAS-3 o ACS-3): Longitud = 2526 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 86). Se predice que codifica para una proteína de 842 aminoácidos (SEQ ID NO: 87), 90,6 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la supuesta proteína (particularmente, los ~700 aminoácidos centrales) con proteínas ACS tipo *Bubble Gum*.

40 4. ScACS-4 (también denominada ScACoAS-4 o ACS-4): Longitud = 2037 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 88). Se predice que codifica para una proteína de 679 aminoácidos (SEQ ID NO: 89), 74,7 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína con proteínas ACS conocidas, incluyendo ejemplos de seres humanos y otros mamíferos.

45 5. ScACS-5 (también denominada ScACoAS-5 o ACS-5): Longitud = 1734 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) (SEQ ID NO: 90). Se predice que codifica para una proteína de 578 aminoácidos (SEQ ID NO: 91), 63,1 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína con proteínas ACS conocidas. Las mejores coincidencias en Blast son con ACS bacterianas. Los tres aminoácidos del extremo C-terminal de SEQ ID NO: 91 son: SKL - un motivo asociado con el direccionamiento de proteínas al peroxisoma.

50 6. ScACS-6 (también denominada ScACoAS-6 o ACS-6): Longitud = 1806 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 92). Se predice que codifica para una proteína de 602 aminoácidos (SEQ ID NO: 93), 66,0 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína con proteínas ACS conocidas. Las mejores coincidencias en Blast son con ACS bacterianas. Los tres aminoácidos del extremo C-terminal de SEQ ID NO: 93 son: SKL - un motivo asociado con el transporte dirigido de proteínas al peroxisoma.

60 7. ScACS-7 (también denominada ScACoAS-7 o ACS-7): Longitud = 1920 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 94). Se predice que codifica para una proteína de 640 aminoácidos (SEQ ID NO: 95), 70,4 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína con proteínas ACS conocidas. Las mejores coincidencias en Blast son con ACS bacterianas.

65 8. ScACS-8 (también denominada ScACoAS-8 o ACS-8): Longitud = 1893 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 96). Se predice que codifica para una proteína de 631 aminoácidos (SEQ ID NO: 97), 70,7 kDa. Las mejores coincidencias en Blast son con miembros de una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos que también pueden tener actividad ACoAS.

9. ScACS-9 (también denominada ScACoAS-9 o ACS-9): Longitud = 2950 (sin incluir el codón de terminación) nucleótidos (SEQ ID NO: 98). Se predice que codifica para una proteína de 766 aminoácidos (SEQ ID NO: 99), 84,1 kDa. Hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína con proteínas ACS conocidas. Las mejores coincidencias en Blast son con ACS de animales.

Los inventores creyeron que puede que las enzimas presentes en huéspedes heterólogos de las AGPI sintasas no puedan procesar eficazmente los ácidos grasos libres (AGL) de AGPI novedosos (para ese organismo), y que la coexpresión de la(s) ACoAS apropiada(s) daría como resultado una acumulación aumentada de los AGPI en ese huésped. Se expresaron individualmente dos de las ACoAS candidatas de *Schizochytrium* descritas anteriormente (ScACS-1, SEQ ID NO: 82/83 y ScACS-2, SEQ ID NO: 84/85) en levaduras que contenían los genes que codifican para el sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* (por ejemplo, sOrfA, sOrfB y nOrfC, y HetI).

Más específicamente, se modificó el sistema de expresión en levaduras descrito en los ejemplos anteriores para adaptarse a la introducción del quinto gen de ACoAS (es decir, la levadura también contenía los Orf A, B y C del sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* y una PPTasa (HetI de *Nostoc*)) usando 4 vectores. Los vectores de expresión en levaduras en los que pueden clonarse dos genes (los vectores pESC) se obtuvieron de Stratagene. Estos vectores son similares a y compatibles con los vectores pYES descritos anteriormente. Se clonaron dos genes, OrfC nativo (nOrfC, SEQ ID NO: 5) y HetI (SEQ ID NO: 33), en un vector pESC, mientras que sOrfA (SEQ ID NO: 35, sOrfB (SEQ ID NO: 36) y el quinto gen (ScACS-1 (SEQ ID NO: 82) o ScACS-2 (SEQ ID NO: 84)) se clonaron en vectores pYES. Se introdujeron los cuatro vectores en levaduras y se indujeron los genes resuspendiendo las células en un medio que contenía galactosa tal como se describió anteriormente. Se hicieron crecer las células a 30°C y se recogieron 18 horas tras la inducción. En la tabla 1 se muestra un resumen del análisis de EMAG de estas células. Las células control contenían los 4 vectores, pero carecían del gen que codifica para Orf A. La coexpresión de una cualquiera de las ScACOAS dio como resultado un aumento en la acumulación de DHA y DPA n-6 (aproximadamente el doble de la cantidad en las células control). Esto proporciona la confirmación de que puede aumentarse la acumulación de los productos de la AGPI sintasa en un huésped heterólogo mediante la coexpresión de enzimas que pueden ser más eficaces en la utilización de esos productos.

Tabla 1

30°C, 18 h tras la introducción	Control (genes de AGPI)	ScACS-1	ScACS-2
Ácido graso	EMAG (% de área)	EMAG (% de área)	EMAG (% de área)
C14:0*	1,7	1,8	2,0
C14:1	0,5	0,5	0,6
C15:0	0,5	0,5	0,5
C16:0*	17,1	16,5	15,5
C16:1*	40,7	38,8	38,5
C18:0*	4,7	4,3	4,2
C18:1 N9*	23,8	22,4	21,9
C18:1 N7	1,3	1,0	1,0
C24:0	0,1	0,1	0,1
C22:5 N6	1,3	2,5	3,1
C26:0	1,7	1,6	1,6
C22:6N3*	2,0	3,8	3,9
DHA más DPAn-6	3,3	6,3	7,0

En experimentos posteriores, también se sometieron a prueba ScACS-3, ScACS-5, ScACS-6 y ScACS-8 en levaduras que contenían los genes que codifican para el sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* (por ejemplo, sOrfA, sOrfB y nOrfC, y HetI), usando métodos similares tal como se describió anteriormente. La expresión de cada uno de ScACS-3, ScACS-5 o ScACS-8 dio como resultado una producción de DHA aumentada en levaduras en comparación con en ausencia del gen de acil-CoA sintetasa añadido (datos no mostrados).

Tal como se indicó anteriormente, ScACS-8 muestra homología con miembros de una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos que también puede tener actividad ACS. Se cree que estas proteínas están asociadas con la membrana plasmática y facilitan la importación de ácidos grasos libres al interior de la célula y también los convierten en derivados de acil-CoA. Las enzimas de esta familia pueden tener utilidad particular cuando se expresan sistemas de AGPI sintasa, que liberan sus productos como ácidos grasos libres, en los plástidos de células vegetales. Se cree que la envuelta externa del plástido se deriva de la membrana plasmática y proteínas dirigidas a la membrana plasmática (tales como ScACS-8) también pueden dirigirse a la envuelta externa del plástido. Si éste es el caso, estas proteínas de transporte de ácidos grasos (tales como ScACS-8), pueden facilitar la exportación de los productos de ácidos grasos libres de la AGPI sintasa del plástido, y también los convierten en los derivados de acil-CoA. A continuación se describe un experimento para proporcionar esta acil-CoA sintetasa en plantas que expresan un sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium*.

Ejemplo 10

5 El siguiente ejemplo demuestra niveles crecientes de AGPI en levaduras que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium*, sin o con ScACoAS-1, mediante crecimiento en presencia de cerulenina, que inhibe la ruta de FAS.

10 Tanto la AGPI sintasa como FAS utilizan malonil-CoA como fuente de carbonos para la síntesis de sus productos de ácido graso. Además, las formas de acil-CoA de ácidos grasos de ambos sistemas pueden servir como sustratos para enzimas que sintetizan PL y TAG. Tal como se comentó anteriormente, cuando tanto la AGPI sintasa como FAS están presentes en un organismo, se espera que la regulación por disminución o la inhibición del sistema de FAS favorezca la acumulación de AGPI. La cerulenina es un inhibidor bien estudiado de las reacciones de condensación de la síntesis de ácidos grasos. El trabajo anterior indicó que las AGPI sintasas son relativamente menos sensibles a la inhibición por cerulenina que los sistemas de FAS.

15 Los presentes inventores sometieron a prueba los efectos de cerulenina sobre perfiles de ácidos grasos de las cepas de levadura descritas en el ejemplo 8 como modelo del concepto de reducción de la actividad FAS. Se sometió a prueba adicionalmente en este sistema la levadura descrita en el ejemplo 9, que también contenía una acil CoA-sintetasa, para determinar si los efectos de las dos estrategias aumentarían aditiva o sinérgicamente la producción de AGPI.

20 Los experimentos iniciales indicaron que el efecto máximo (es decir, como un aumento en AGPI como porcentaje del perfil de ácidos grasos totales) se obtenía a una concentración de cerulenina 4 μ M. La cerulenina se añadió 4 horas tras la transferencia al medio de inducción de galactosa. Se recogieron las células 18 h tras la transferencia al medio de inducción, se liofilizaron, se prepararon EMAG y se analizaron mediante CG.

25 Las cepas de levadura sometidas a prueba fueron:

- Cepa 5.5 que contenía los genes de AGPI sintasa (sOrfA, sOrfB, OrfC y HetI), tal como se describe en el ejemplo 8 anteriormente; y
- 30 • Cepa 5.6 que contenía el conjunto de genes de AGPI sintasa de la cepa 5.5 más ScACoAS-1 (SEQ ID NO: 82), tal como se describe en el ejemplo 9 anteriormente.

Haciendo referencia a la tabla 2, "Cer 0" indica que no se añadió cerulenina, y "Cer 4 μ M" indica que se prepararon los medios para cerulenina 4 μ M 4 horas tras la transferencia al medio de inducción. Se evaluó cada cepa para determinar la producción de ácidos grasos en presencia y ausencia de la cerulenina, para evaluar el efecto de la inhibición de la ruta de FAS sobre la producción de AGPI. La tabla 2 muestra los principales ácidos grasos detectados en el perfil de CG (véase también la figura 11). Los valores se facilitan como porcentaje de los ácidos grasos totales detectados. DHA y DPAn-6, que son los productos del sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium*, fueron los únicos AGPI presentes en los perfiles. La suma de DHA más DPAn-6 también se indica en la tabla 2. Las figuras 9 y 10 ilustran la cantidad de DHA (figura 9) o DHA y DPAn-6 (figura 10; las barras blancas son DHA; las barras negras son DHA + DPAn-6) producida por la levadura, como porcentaje de EMAG total.

45 Las células de levadura sin los genes de AGPI sintasa no producen ningún AGPI detectable. La expresión del sistema de AGPI sintasa en levaduras en este experimento dio como resultado la acumulación del 1,2% de DHA. La inclusión del gen de ScACoA-1 (SEQ ID NO: 82) aumentó el nivel de DHA hasta el 4,1%. El crecimiento de las células con sólo el sistema de AGPI sintasa en presencia de cerulenina 4 μ M (inhibición del sistema de FAS) aumentó el nivel de DHA hasta el 3,7%. Cuando se hicieron crecer las células que expresaban tanto los genes de AGPI sintasa como los de ScACoAS-1 en cerulenina 4 μ M (es decir, expresión de una acil-CoA sintetasa e inhibición del sistema de FAS combinadas), el nivel de DHA aumentó hasta el 8,2% de los ácidos grasos totales. En todas las muestras, hubo un aumento correspondiente en la acumulación de DPAn-6. La suma de DHA más DPA n-6 en las muestras también se muestra en la tabla 2 estando presente la mayor cantidad (el 14,5% de los ácidos grasos totales) en la cepa 5.6 hecha crecer en cerulenina 4 μ M. Pueden observarse que los efectos de la expresión del gen de ACoA sintetasa y el crecimiento en presencia de cerulenina son aditivos. Estos datos apoyan la invención propuesta en el presente documento para aumentar la acumulación de AGPI en huéspedes heterólogos.

55

Tabla 2

Ácido graso	Cepa 5.5 Cer 0	Cepa 5.5 Cer 4 μ M	Cepa 5.6 Cer 0	Cepa 5.6 Cer 4 μ M
C14:0	1,5	0,0	1,7	0,0
C16:0	17,5	4,9	17,5	6,1
C16:1	43,4	38,4	41,7	34,8
C18:0	5,8	3,8	5,3	4,5
C18:1 N9	26,2	40,4	23,7	35,3
C18:1 N7	0,9	0,8	0,0	0,6
C22:5 N6	0,9	2,9	2,8	6,3

C26:0	2,0	2,9	1,9	2,4
C22:6 N3	1,3	3,7	4,1	8,2
DHA más DPA N6	2,1	6,6	6,9	14,5

Ejemplo 11

5 El siguiente ejemplo describe la identificación de proteínas auxiliares adicionales o dianas para su uso en el aumento de la producción de AGPI y/o la acumulación en huéspedes heterólogos.

10 Las enzimas presentes en *Schizochytrium* utilizan eficazmente las formas de acil-CoA de los productos de la AGPI sintasa para sintetizar moléculas de fosfolípido (PL) y triacilglicerol (TAG). Sin embargo, las enzimas presentes en huéspedes heterólogos pueden no llevar a cabo estas reacciones con eficacia similar, puesto que puede que esos organismos pueden no encontrarse normalmente con estos AGPI-CoA. Por ejemplo, la expresión de enzimas de síntesis de PL o TAG que integran eficazmente los productos de acil-CoA de las diversas AGPI sintasas (por ejemplo, DHA-CoA, DPA n-6-CoA, EPA-CoA u otros) en moléculas de PL o TAG en esos huéspedes heterólogos pueden dar como resultado el aumento de la capacidad para acumular esos productos. Con respecto a esto, *Schizochytrium*, u otros organismos que producen AGPI a través de la ruta de AGPI sintasa, puede servir como una buena fuente de genes que codifican para esas enzimas. Por consiguiente, los presentes inventores proponen el uso de varias proteínas aciltransferasa que utilizan AGPI-CoA como sustratos en la formación de PL o TAG (por ejemplo, 3-glicerol-fosfato aciltransferasas (GPAT), ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAAT) y diacilglicerol aciltransferasas (DAGAT)) u otras aciltransferasas que pueden dar como resultado el enriquecimiento de AGPI en PL o TAG (por ejemplo, fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasas (PDAT)). La identificación de varias de tales aciltransferasas se describe a continuación. Algunos de los candidatos se han sometido a prueba en levadura y están sometiéndose a prueba en plantas.

Enzimas DAGAT

25 Los presentes inventores han examinado la base de datos de EST de *Schizochytrium* para determinar los EST que muestran homología con proteínas con actividades DAGAT conocidas (o sospechadas). Los inventores identificaron tres candidatos como posibles enzimas DAGAT para su uso conjuntamente con un sistema de PKS de AGPI, uno de los cuales se describe a continuación y se ha demostrado que está implicado en la acumulación de ácidos grasos libres en las moléculas de TAG en *Schizochytrium*:

30 DAGAT de *Schizochytrium* (también denominada DAGAT-1 o ScDAGAT-1)- Longitud de la región codificante = 1518 nucleótidos (sin incluir el codón de terminación) (SEQ ID NO: 100). Se predice que codifica para una proteína de 506 aminoácidos (SEQ ID NO: 101), 57,4 kDa. Hay buena homología a lo largo de dos tercios de la proteína (comenzando en ~ aminoácido 170 y continuando hasta el extremo C-terminal) con proteínas identificadas como enzimas DAGAT tipo 2B. Un análisis de Blast del primer tercio de la secuencia de la proteína (aminoácidos 1 a 170) no reveló homología significativa con ninguna proteína y no detectó ninguna coincidencia de Pfam.

40 Usando la tecnología de desactivación descrita anteriormente en el ejemplo 1 para FAS en *Schizochytrium*, los inventores desactivaron de manera similar el gen de DAGAT (que comprende la SEQ ID NO: 100) en una cepa de *Schizochytrium*, denominada B73-8. Tal como se muestra en la figura 13, la inactivación del gen de DAGAT en *Schizochytrium* inhibió significativamente la acumulación de ácidos grasos en el TAG. Específicamente, la inactivación de DAGAT dio como resultado aproximadamente una reducción del 80% en los mg de EMAG/mg de biomasa y aproximadamente una reducción del 90% en TAG. Por consiguiente, los inventores concluyeron que esta DAGAT es la principal enzima responsable de la síntesis de TAG en *Schizochytrium*.

45 Por consiguiente, se espera que la expresión de esta molécula de ácido nucleico en un huésped (por ejemplo, levaduras, plantas) que expresa un sistema de PKS de AGPI descrito en el presente documento aumentará la acumulación de ácidos grasos libres en PL o TAG. A continuación se describe un experimento representativo que expresa este gen en una planta transgénica.

Enzimas LPAAT

50 Los presentes inventores también han examinado la base de datos de EST de *Schizochytrium* para determinar los EST que muestran homología con proteínas con actividades LPAAT conocidas (o sospechadas). Los inventores ensamblaron éstos en cóntigos (cuando estaban disponibles dos o más secuencias solapantes) y los editaron basándose en la calidad de la información de secuencia individual tal como se describió anteriormente. Los resultados de este esfuerzo se resumen a continuación. Se identificaron tres cóntigos diferentes y un singlete (secuencias no solapantes en la base de datos) que eran candidatos particularmente buenos para asociarse con enzimas LPAAT. Se reconoce que las enzimas codificadas por estas secuencias pueden tener actividades relacionadas con, pero diferentes de, la supuesta actividad LPAAT. En los cuatro casos, se identificó un supuesto Orf (incluyendo codones de iniciación y terminación). Se reconoce que a medida que se obtengan más datos puede cambiar la representación precisa de la secuencia, incluyendo la identificación del codón de iniciación endógeno.

Candidatos de LPAAT de *Schizochytrium* identificados mediante análisis de la base de datos de EST:

- 5 1. Cóntigo ScLPAAT-1: Longitud = 1478 nucleótidos (SEQ ID NO: 102). Parece incluir un Orf de longitud completa de 927 nt (incluyendo el codón de terminación, CDS de ScLPAAT-1, SEQ ID NO: 103). Una búsqueda en Blast usando la traducción de la CDS (SEQ ID NO: 104) muestra que hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína codificada con proteínas aciltransferasa conocidas y supuestas. Las mejores coincidencias son con proteínas de *Arabidopsis*. El análisis Pfam indica un gran dominio central conservado relacionado con la familia PlsC (1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, es decir, LPAAT).
- 10 2. Cóntigo ScLPAAT-2: Longitud = 2112 nucleótidos (SEQ ID NO: 105). Parece incluir un Orf de longitud completa de 1140 nt (incluyendo el codón de terminación, CDS de ScLPAAT-2, SEQ ID NO: 106). Una búsqueda en Blast usando la traducción de la CDS (SEQ ID NO: 107) muestra que hay buena homología a lo largo de la mayor parte de la proteína codificada con proteínas aciltransferasa conocidas y supuestas. Las mejores coincidencias son con proteínas de *Arabidopsis*. El análisis Pfam indica un gran dominio central conservado relacionado con la familia PlsC (1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, es decir, LPAAT).
- 15 3. Cóntigo ScLPAAT-3: Longitud = 1862 nucleótidos (SEQ ID NO: 108). Parece incluir un Orf de longitud completa de 1323 nt (incluyendo el codón de terminación, CDS de ScLPAAT-3, SEQ ID NO: 109). Una búsqueda en Blast usando la traducción de la CDS (SEQ ID NO: 110) muestra que hay buena homología a lo largo de la parte central de la proteína codificada con aciltransferasas conocidas y supuestas. Las mejores coincidencias son con proteínas de mamíferos. El análisis Pfam indica un gran dominio central conservado relacionado con la familia PlsC (1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, es decir, LPAAT).
- 20 4. Singlete ScLPAAT-4: Longitud = 794 nucleótidos (SEQ ID NO: 111). Parece incluir un Orf de longitud completa de 756 nt (incluyendo el codón de terminación, CDS de ScLPAAT-4, SEQ ID NO: 112). Una búsqueda en Blast usando la traducción de la CDS (SEQ ID NO: 113) muestra que hay buena homología a lo largo de gran parte de la proteína codificada con aciltransferasas conocidas y supuestas. Las mejores coincidencias son con proteínas de aves y mamíferos. El análisis Pfam indica un gran dominio central conservado relacionado con la familia PlsC (1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, es decir, LPAAT).
- 25 30

ScLPAAT-1 se ha clonado y expresado en levaduras y plantas.

Enzimas DAGAT o LPAAT adicionales

35 Los inventores también han examinado la base de datos de EST de *Cryptocodinium cohnii* para determinar los EST que muestran homología con proteínas con actividades DAGAT o LPAAT conocidas o sospechadas. Los resultados de este esfuerzo se resumen a continuación.

40 A) Candidatos de DAGAT de *Cryptocodinium cohnii* identificados mediante análisis de la base de datos de EST:

- 45 1. CA5 PTA.838.C: Longitud = 817 nucleótidos (SEQ ID NO: 114). Hay buena homología a lo largo de los últimos 274 nucleótidos de esta secuencia con una secuencia de aciltransferasa de *Cryptocodinium* descrita en la publicación PCT n.º WO 2004/087902.
2. CA5 PTA.131.C1: Longitud = 850 nucleótidos (SEQ ID NO: 115).
3. CA12 cot10 003a h10: Longitud = 663 nucleótidos (SEQ ID NO: 116)
- 50 4. CA12 cot10 001a h02: Longitud = 807 nucleótidos (SEQ ID NO: 117)
5. CA12 cot10 005b g12: Longitud = 765 nucleótidos (SEQ ID NO: 118)
6. CA12 cot50 005c d07: Longitud = 782 nucleótidos (SEQ ID NO: 119)
- 55

B) Candidatos de LPAAT de *Cryptocodinium cohnii* identificados mediante análisis de la base de datos de EST:

- 60 1. CA12 cot10 003a e11: Longitud = 793 nucleótidos (SEQ ID NO: 120)
2. CA12 PTA.739.C1: Longitud = 744 nucleótidos (SEQ ID NO: 121)

Puede usarse una cualquiera o más de las moléculas de ácido nucleico descritas en este ejemplo para transformar cualquier célula huésped, incluyendo para producir cualquiera de los organismos modificados genéticamente (por ejemplo, plantas o microorganismos) descritos en el presente documento para potenciar adicionalmente la acumulación de AGPI en un organismo, y particularmente, en un organismo que expresa un sistema de PKS de AGPI. Estas enzimas también pueden tener utilidad cuando se expresan en un organismo huésped que produce

65

AGPI mediante la ruta de ácido graso sintasa clásica o convencional. Tales constructos pueden usarse solos con el sistema de PKS de AGPI o en combinación con las otras estrategias para potenciar la producción y acumulación de AGPI en un organismo huésped tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, con la expresión de una acil-CoA sintetasa o con la inhibición de la ruta de FAS). También se considera que secuencias de aciltransferasa adicionales descritas en la publicación PCT n.º WO 2004/087902 son potencialmente útiles en la presente invención.

Ejemplo 12

El siguiente ejemplo describe la expresión de genes que codifican para la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI en *Arabidopsis* y la producción de los AGPI, DHA y DPA-n-6 objetivo, en ausencia sustancial de cualquier producto intermedio o producto secundario detectable.

Se clonaron los OrfA (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1), OrfB* (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 37) y OrfC (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 5) de *Schizochytrium* junto con HetI (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 33) (por separado o en diversas combinaciones incluyendo los 4 genes en un superconstructo) en los vectores binarios apropiados para la introducción de los genes en plantas. Ejemplos de tales constructos y vectores se describen a continuación (tres constructos de expresión) y también en el ejemplo 13 (un "superconstructo" para 4127).

Construcción de 5720: Orf B* (expresión en plástidos)

Se clonó por restricción el Orf B* (que codifica para SEQ ID NO: 4), en un casete de expresión bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591). El promotor de linina controla la expresión temporal específica y específica de tejido del transgén/de los transgenes durante el desarrollo de la semilla. Directamente en el sentido de 5' y en marco del Orf B* de *Schizochytrium* estaba la secuencia de direccionamiento a plástido derivada de la acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* (péptido señal de PT), para dirigir el Orf B* al plástido. El vector binario vegetal también contenía un gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* existente (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 4107: HetI y Orf C (expresión en plástidos)

Se clonaron el Orf C de *Schizochytrium* (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 5) junto con HetI (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 33) en casetes de expresión bajo el control de un promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591). El promotor de linina controla la expresión temporal específica y específica de tejido del transgén/de los transgenes durante el desarrollo de la semilla. Directamente en el sentido de 5' y en marco del Orf C de *Schizochytrium* y HetI estaba la secuencia de direccionamiento a plástido derivada de la acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* (péptido señal de PT), para dirigir la AGPI sintasa y la PPTasa al plástido. Entonces se ensamblaron ambos casetes de expresión en un vector binario vegetal que contenía un gen pat que confiere a la planta huésped resistencia a fosfotricina (Wohlleben *et al.*, 1988, Gene 70:25-37) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha.

Construcción de 4757: Orf A (expresión en plástidos)

Se clonó el Orf A (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1) de *Schizochytrium* en casetes de expresión bajo el control de un promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591). El promotor de linina controla la expresión temporal específica y específica de tejido del transgén/de los transgenes durante el desarrollo de la semilla. Directamente en el sentido de 5' y en marco del Orf A de *Schizochytrium* estaba la secuencia de direccionamiento a plástido derivada de la acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* (péptido señal de PT), para dirigir la AGPI sintasa y la PPTasa al plástido. El casete de expresión estaba contenido dentro de un vector binario vegetal que contenía un gen nptII que confiere a la planta huésped resistencia a kanamicina dirigido por el promotor/terminador de MAS entre las secuencias límite izquierda y derecha.

En un ejemplo, se clonaron los transgenes en tres casetes de expresión separados: un constructo denominado 5720 (que contenía OrfB*, que codifica para SEQ ID NO: 4), un constructo denominado 4107 (que contenía OrfC, que codifica para SEQ ID NO: 6 y HetI, que codifica para SEQ ID NO: 34) y un constructo denominado 4757 (que contenía OrfA, que contiene SEQ ID NO: 2), tal como se describió anteriormente. En cada constructo, se clonó el gen. Para dirigir las proteínas al plástido, se ubicaron secuencias en 5' adicionales que codifican para una secuencia de direccionamiento a plástido derivada de una acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* directamente en el sentido de 5' de los Orf A, B*, C y HetI. La secuencia de aminoácidos del péptido de direccionamiento codificado es: MLKLSNVTNHLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTLAVS (SEQ ID NO: 81). Las secuencias de nucleótidos que codifican para este péptido se colocaron en marco con los codones de iniciación de metionina de cada Orf de AGPI sintasa, así como el codón de iniciación modificado por ingeniería genética (ATG) de HetI. En otros constructos, en los que la

ubicación de la AGPI sintasa se dirigió al citoplasma de células vegetales, no se añadieron secuencias codificantes de proteínas adicionales al extremo 5' de los Orf.

5 Se usaron métodos convencionales para la introducción de los genes en *Arabidopsis* (inmersión floral en suspensión de cepas de *Agrobacterium* que contienen los vectores apropiados, tal como se describe en Clough *et al.*, 1998, Plant J. 16: 735-743). Los detalles de los métodos se describen en el ejemplo 13 a continuación. Se plantaron semillas obtenidas de estas plantas en medio selectivo y se permitió que germinaran. Algunas de las plantas que crecieron se dejaron hasta la madurez y se analizaron las semillas para determinar el contenido en AGPI. Basándose en el contenido en AGPI, algunas de estas semillas prosiguieron hasta la siguiente generación. Se
10 analizaron las semillas reunidas obtenidas de esas plantas para determinar su contenido en ácidos grasos. Los AGPI objetivo esperados de estas plantas transgénicas eran ácido docosahexanoico (DHA) y ácido docosapentanoico (DPA n-6), que son los AGPI primarios producidos por el sistema de PKS de AGPI de *Schizochytrium* a partir del cual se derivaron los genes usados para transformar las plantas.

15 Los resultados de un análisis de ácidos grasos a modo de ejemplo en una de las líneas de plantas transgénicas a modo de ejemplo se muestran en la figura 13. El panel superior de la figura 13 muestra el perfil de ácidos grasos típico de semillas de *Arabidopsis* de tipo natural tal como se representa mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de una muestra de semillas reunidas. Los ácidos grasos predominantes son: 16:0, 18:0, 16:1, 18:1, 20:1, 20:2 y 22:1. No están presentes DHA o DPA n-6 en las muestras de semillas de tipo natural.

20 El panel inferior de la figura 13 muestra el perfil de ácidos grasos de una muestra de semillas reunidas de una de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* a modo de ejemplo (línea 263) que expresa el gen de Het1 y los genes de AGPI sintasa de *Schizochytrium*, introducidos a partir de tres casetes de expresión separados (5720, 4107 y 4757) dirigidos todos ellos al plástido, tal como se describió anteriormente. Haciendo referencia al perfil de ácidos grasos de la línea 263, se observa fácilmente que están presentes dos picos de EMAG en el perfil de las semillas de plantas transgénicas que no están presentes en el perfil de las semillas de tipo natural. El patrón de elución de estos dos picos corresponde exactamente a la elución de DHA y DPA n-6 auténticos (usando EMAG preparados a partir de aceite de *Schizochytrium* como patrones, así como un patrón de DHA adquirido comercialmente de NuCheck Prep).
25 En este ejemplo particular, el pico de DHA representa el 0,8% de los EMAG calculados totales, mientras que el pico de DPA n-6 representa el 1,7%. La suma de AGPI novedosos es el 2,5% de los EMAG totales.

30 Los experimentos con otras líneas de plantas transgénicas dieron resultados similares. Por ejemplo, otra línea transgénica, denominada 269, que se transformó con los mismos constructos y de la misma forma que la línea 263, produjo aproximadamente el 0,75% de DHA de los EMAG calculados totales, y el 1,41% de DPA n-6 de los EMAG calculados totales (datos no mostrados).

35 Además, otras múltiples plantas de *Arabidopsis* transgénicas producidas usando las mismas moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente también produjeron los AGPI objetivo, independientemente de si se producían usando constructos que proporcionaban los genes de PKS de AGPI y la Het1 PPTasa en constructos separados, constructos de combinación o un único superconstructo (datos mostrados a continuación en el ejemplo 13).

40 Además, las plantas transgénicas que dirigen los genes de PKS de AGPI al citosol expresaban todas ellas los AGPI objetivo (datos no mostrados en detalle). Por ejemplo, una línea de planta que expresa la PKS de AGPI de *Schizochytrium* más Het1 en el citosol introducidos en tres casetes de expresión separados tal como se describió anteriormente (sin la secuencia de direccionamiento a plástido) produjo aproximadamente el 0,45% de DHA y aproximadamente el 0,8% de DPA as un porcentaje de EMAG totales. En otro ejemplo, una línea de planta que expresa la PKS de AGPI de *Schizochytrium* más Het1 en el citosol introducidos en un único superconstructo (similar al descrito en el ejemplo 13 a continuación) produjo aproximadamente el 0,2-0,3% de DHA y aproximadamente el 0,5% de DPA como porcentaje de EMAG totales.

45 La aparición de DHA y DPA n-6 en el perfil de ácidos grasos de las semillas mostrado en la figura 13 (y tal como se observa en otras líneas transgénicas, algunas de las cuales se han descrito anteriormente) demuestra que el sistema de AGPI sintasa de *Schizochytrium* introducido funciona cuando se expresa en la célula vegetal y que las proteínas pueden dirigirse al plástido. Además, los inventores han confirmado que las proteínas también pueden dirigirse al citosol, o tanto al plástido como al citosol, y producir AGPI. Tal como se predice a partir de los datos de expresión heteróloga y bioquímicos en otros huéspedes (por ejemplo, en *E. coli* y en levaduras) los únicos ácidos grasos novedosos detectados en el perfil de la semilla de las plantas transgénicas son DHA y DPA n-6 (es decir, el perfil de ácidos grasos está sustancialmente libre de productos intermedios o productos secundarios contaminantes que resultan del sistema enzimático de producción de AGPI), lo que ilustra adicionalmente las ventajas del sistema de PKS de AGPI con respecto a las enzimas de la ruta convencional para la producción de AGPI en una planta.
50
55
60

Ejemplos 13(a) - 13(i)

65 Los siguientes ejemplos describen el uso de diversas estrategias descritas en el presente documento (incluyendo combinaciones de estrategias) para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en plantas.

Específicamente, los siguientes ejemplos describen la expresión de genes que codifican para la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (nOrfA, Orf B* y nOrfC) junto con HetI en semillas de *Arabidopsis*, solos o en combinación con otras proteínas auxiliares y/o estrategias de modificación genética para potenciar la producción y acumulación de AGPI. Específicamente, HetI y AGPI sintasa de *Schizochytrium* se expresan en plantas solas o en combinación con: (1) un gen que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACS), o (2) con elementos genéticos destinados a inhibir la actividad FAS endógena. Además, se muestra un ejemplo del uso combinado de HetI y la AGPI sintasa de *Schizochytrium* en combinación con la expresión de un gen de ACS y un elemento genético destinado a inhibir la actividad FAS endógena. Finalmente, a continuación se describen ejemplos de expresión de aciltransferasas, incluyendo DAGAT y/o LPAAT, solas o en combinación con la expresión de una o más acil-CoA sintetasas y elementos genéticos destinados a inhibir la actividad FAS endógena. Las estrategias explicadas resumidamente en el presente documento ilustran la capacidad para establecer cualquiera de los conceptos descritos en los ejemplos anteriores en plantas.

Materiales y métodos para el ejemplo 13(a)-(j)

(1) Constructos

Construcción del constructo 412Z: Péptido señal de PT: nORFA, péptido señal de PT: nORFB*, péptido señal de PT: HetI, péptido señal de PT: nORFC (expresión dirigida a plástido de AGPI sintasa de *Schizochytrium* con HetI)

Se clonaron OrfA nativo (nOrfA, representado por SEQ ID NO: 1, que codifica para SEQ ID NO: 2), OrfB* sintético (sintetizado de nuevo) (OrfB*, representado por SEQ ID NO: 37 y que codifica para SEQ ID NO: 4) y OrfC nativo (nOrfC, representado por SEQ ID NO: 5 y que codifica para SEQ ID NO: 6) de *Schizochytrium*, junto con HetI de *Nostoc* (representado por SEQ ID NO: 33 y que codifica para SEQ ID NO: 34) en casetes de expresión bajo el control de un promotor/terminador de linina de lino (véase la patente estadounidense n.º 6.777.591 con respecto al promotor/terminador). El promotor de linina controla la expresión temporal específica y específica de tejido del transgén/de los transgenes durante el desarrollo de la semilla. Directamente en el sentido de 5' y en marco de los Orf A, B*, C y HetI de *Schizochytrium* estaba la secuencia de direccionamiento a plástido derivada de la acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* (a la que se hace referencia en el presente documento como un péptido señal de PT, cuya secuencia de aminoácidos está representada por SEQ ID NO: 81), también descrita en el ejemplo 12, para dirigir la AGPI sintasa y la PPTasa al plástido. Entonces se ensamblaron los cuatro casetes de expresión en un vector binario vegetal que contenía un gen *pat* que confiere a la planta huésped resistencia a fosfotricina (Wohlleben *et al.*, 1988, Gene 70:25-37) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha.

Construcción de 5723: ACS-1 (expresión en citosol)

Para la expresión de una acil-CoA sintetasa, se construyó un vector binario vegetal separado para expresar la secuencia de ácido nucleico para ACS-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 82, que codifica para SEQ ID NO: 83). Se subclonó y se secuenció la ACS-1, con sitios de restricción apropiados modificados por ingeniería genética en los extremos 5' y 3'. Entonces se clonó por restricción la ACS-1 en un casete de expresión bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

También se produjeron constructos similares para la expresión de las acil-CoA sintetasas a las que se hace referencia en el presente documento como ACS-2 (SEQ ID NO: 84/85) y ACS-8 (SEQ ID NO: 96/97), 5724 y 5730 respectivamente. En un aspecto, se combinaron las secuencias de acil-CoA sintetasa con moléculas de ácido nucleico que codifican para una DAGAT (SEQ ID NO: 100/101) y/o LPAAT (SEQ ID NO: 102/103/104), tal como se describe a continuación.

Construcción de 5727: iARN de KAS II con el intrón de CHSA (expresión citosólica de iARN de KAS II con el intrón)

Para la inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS II. En este caso, se seleccionó como diana una región de 499 pb del transcrito de KAS II codificado nuclear codificado por el locus At1g74960 (Carlsson *et al.*, 2002, Plant J. 29: 761-770) mediante interferencia de ARN (iARN) con un intrón intermedio derivado del gen de chalcona sintasa A (CHSA) de petunia (McGinnis *et al.*, 2005, Methods in Enzymology 392:1-24; Koes *et al.*, 1989, Gene 81: 245-257). Se clonó la iARN de KAS II con el intrón de CHSA (representado por SEQ ID NO: 122) en un vector binario vegetal entre el promotor/terminador de linina (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 5729: ARN antisentido de KAS III (expresión en citosol de ARN antisentido de KAS III)

Para la inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS III. En este caso, se seleccionó como diana una secuencia de KAS III antisentido de 1210 pb derivada del transcrito codificado nuclear codificado por el locus At1g62640 (Yamada *et al.*, 2002, número de registro de GenBank AY091275). Se clonó la secuencia antisentido de KAS III (representada en el presente documento por SEQ ID NO: 125) en un vector binario vegetal entre el promotor/terminador de linina (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 5731: ACS-1 e iARN de KAS II con el intrón (expresión en citosol)

Para la expresión de una acil-CoA sintetasa combinada con inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS II y para expresar la secuencia de ácido nucleico para ACS-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 82, que codifica para SEQ ID NO: 83). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de ACS-1 e iARN de KAS II con el intrón bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 5732: ACS-1 y KAS II antisentido (expresión en citosol)

Para la expresión de una acil-CoA sintetasa combinada con inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS II y para expresar la secuencia de ácido nucleico para ACS-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 82, que codifica para SEQ ID NO: 83). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de ACS-1 y molécula antisentido de KAS II con el intrón (secuencia antisentido de KASII representada en el presente documento por SEQ ID NO: 123) bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 5733: ACS-1 e iARN de KAS III (expresión en citosol)

Para la expresión de una acil-CoA sintetasa combinada con inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS III y para expresar la secuencia de ácido nucleico para ACS-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 82, que codifica para SEQ ID NO: 83). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de ACS-1 e iARN de KAS III (secuencia de iARN de KAS III representada en el presente documento por SEQ ID NO: 124) bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 5734: ACS-1 y ARN antisentido de KAS III (expresión en citosol)

Para la expresión de una acil-CoA sintetasa combinada con inhibición de FAS, se construyó un vector binario vegetal separado para atenuar la expresión de KAS III y para expresar la secuencia de ácido nucleico para ACS-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 82, que codifica para SEQ ID NO: 83). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de ACS-1 y molécula antisentido de KAS III bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía el gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (Miles y Guest, 1984, Gene 32: 41-48) dirigido por el promotor/terminador de ubiquitina de *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) entre las secuencias límite izquierda y derecha para la selección positiva (Haldrup *et al.*, 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296).

Construcción de 4793: DAGAT

Para la expresión de una DAGAT, se construyó un vector binario vegetal separado para expresar la secuencia de ácido nucleico para DAGAT-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 100, que codifica para SEQ ID NO: 101). Se clonó DAGAT de *Schizochytrium* (secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 100) en casetes de expresión bajo el control de un promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591). El promotor de linina controla la expresión temporal específica y específica de tejido del transgén/de los transgenes durante el desarrollo de la semilla. El casete de expresión estaba contenido dentro de un vector binario vegetal que contenía un

gen nptII que confiere a la planta huésped resistencia a kanamicina dirigido por el promotor/terminador de MAS entre las secuencias límite izquierda y derecha.

Construcción de 4794: DAGAT y ACS-8

5 Para la expresión de una DAGAT y una acil-CoA sintetasa, se construyó un vector binario vegetal separado para expresar: (1) la secuencia de ácido nucleico para DAGAT de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 100, que codifica para SEQ ID NO: 101), y (2) la secuencia de ácido nucleico para ACS-8 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 96, que codifica para SEQ ID NO: 97). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de ACS-8 y DAGAT bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía un gen nptII que confiere a la planta huésped resistencia a kanamicina dirigido por el promotor/terminador de MAS entre las secuencias límite izquierda y derecha.

Construcción de 4795: LPAAT y DAGAT

15 Para la expresión de una LPAAT y una DAGAT, se construyó un vector binario vegetal separado para expresar: (1) la secuencia de ácido nucleico para LPAAT de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 103, que codifica para SEQ ID NO: 104, y (2) la secuencia de ácido nucleico para DAGAT-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 100, que codifica para SEQ ID NO: 101). Para este constructo se expresó un casete de expresión doble de LPAAT y DAGAT bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía un gen nptII que confiere a la planta huésped resistencia a kanamicina dirigido por el promotor/terminador de MAS entre las secuencias límite izquierda y derecha.

Construcción de 4796: ACS-8, LPAAT y DAGAT

25 Para la expresión de una acil-CoA sintetasa, LPAAT y DAGAT, se construyó un vector binario vegetal separado para expresar: (1) la secuencia de ácido nucleico para LPAAT de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 103, que codifica para SEQ ID NO: 104, (2) la secuencia de ácido nucleico para DAGAT-1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 100, que codifica para SEQ ID NO: 101), y (3) la secuencia de ácido nucleico para ACS-8 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 96, que codifica para SEQ ID NO: 97). Para este constructo se expresó un casete de expresión triple de ACS-8, LPAAT y DAGAT bajo el control del promotor/terminador de linina de lino (patente estadounidense n.º 6.777.591) en un vector binario vegetal que contenía un gen nptII que confiere a la planta huésped resistencia a kanamicina dirigido por el promotor/terminador de MAS entre las secuencias límite izquierda y derecha.

35 (2) Transformación de Arabidopsis

Se confirmó la integridad de todos los vectores binarios vegetales mediante digestos de restricción de diagnóstico y análisis de secuencia. Entonces se usaron plásmidos aislados para transformar la cepa de *Agrobacterium* EH101 competente (Hood *et al.*, 1986, J. Bacteriol. 144: 732-743) mediante electroporación (25 µF, 2,5 kV, 200 Ω). Se sembraron en placa *Agrobacterium* recombinantes en AB-espectinomicina/kanamicina (20x sales de AB, glucosa 2 M, FeSO₄ · 7H₂O 0,25 mg/ml, MgSO₄ 1 M, CaCl₂ 1 M) y se usó una única colonia para inocular 5 ml de caldo de AB-espectinomicina/kanamicina. Se hicieron crecer estos cultivos durante la noche a 28°C. Entonces se usaron las agrobacterias recombinantes que contenían el plásmido 4127 para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* C24 de tipo natural mediante el método de inmersión de flores (Clough *et al.*, 1998, Plant J. 16: 735-743). Se plantaron las semillas obtenidas de estas plantas en medio selectivo en presencia de fosfotricina y se permitió que germinaran. Se transfirieron las plántulas identificadas positivamente a suelo y se dejaron hasta la madurez, tras lo cual se analizaron las semillas para determinar el contenido en AGPI.

50 Para *Agrobacterium* recombinante que contenía los otros plásmidos (5723, 5724, 5730, 5727, 5729, 5731, 5732, 5733, 5734, 4793, 4794, 4795 y/o 4796), volvieron a transformarse plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas 4127-línea 150 mediante el método de inmersión de flores (Clough *et al.*, 1998, Plant J. 16: 735-743). Se plantaron las semillas obtenidas de estas plantas en medio selectivo en presencia de fosfotricina y manosa para la selección doble o fosfotricina, manosa y kanamicina o fosfotricina y kanamicina para la selección triple, según era apropiado, y se permitió que germinaran. Se transfirieron las plántulas identificadas positivamente al suelo y se dejaron hasta la madurez, tras lo cual se analizaron las semillas para determinar el contenido en AGPI.

Ejemplo 13a

60 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI en un superconstructo (4127).

65 Los análisis de EMAG mediante CG de semillas reunidas de plantas de *Arabidopsis* que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI (constructo 4127) revelaron niveles significativos de los AGPI objetivo, DHAn-3 y DPAn-6, en su contenido en ácidos grasos. Tal como se muestra en la tabla 3, una línea en particular (4127-línea 150) mostró el 0,6% de DHAn-3 y el 0,7% de DPAn-6 para un contenido en AGPI de tipo *Schizochytrium* combinado del 1,3%. Tal como se esperaba, las semillas control de la referencia de tipo natural

(C24) no contienen ningún nivel detectable ni de DHAn-3 ni de DPAn-6. El análisis de expresión posterior de 4127-línea 150 realizado mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western reveló OrfA, OrfB*, OrfC y HetI expresados en la semilla recombinante dirigidos correctamente al plástido (datos no mostrados). Además, este fenotipo era estable a partir del análisis de la generación T2 hasta el análisis de la generación T4, lo que sirvió como control positivo para determinar los niveles de DHA y AGPI de *Schizochytrium* cuando se evaluaron diversas estrategias descritas en el presente documento (incluyendo combinaciones de estrategias) para aumentar la producción y/o acumulación de AGPI en plantas.

Tabla 3. Niveles de DHA y DPA en semillas de *Arabidopsis* de tipo natural maduras en comparación con semillas transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) en poblaciones de semillas reunidas T2 y T4 seleccionadas de plantas positivas para fosfinotricina. Se determinaron el % de DHAn-3 y el % de DPAn-6 tras la separación por CG y la detección FID de los EMAG calculados totales.

Estrategia	Genotipo	Línea	Generación	Fenotipo		
				% de DHA (C22:6 n-3)	% de DPA (C22:5 n-6)	% de DHA + DPA
Control negativo	Tipo natural (semillas reunidas)	Ecotipo C24	N/A	0	0	0
AGPI sintasa + HetI	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (semillas reunidas)	4127-línea 150	T2	0,6	0,7	1,3
			T4	0,6	0,6	1,2

Ejemplo 13b

Este ejemplo describe la producción de DHAn-3 y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (Orf A, Orf B* y Orf C) con HetI (4127) en combinación con el gen de ScACS-1 (5723) o el gen de ScACS-2 (5724) de *Schizochytrium*.

Se usaron plantas derivadas de 4127-línea 150 (véase el ejemplo 13a) para la introducción del constructo de ScACS-1 (5723) o el constructo de ScACS-2 (5724) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfinotricina como de manosa, se recogieron las semillas y se analizaron para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

Como ejemplo, una línea que expresaba en particular la PKS de *Schizochytrium* junto con HetI en combinación con ACS-1 (4127/5723-línea 514) mostró el 1,5% de DHA y el 0,9% de DPAn-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 2,5% en el perfil de ácidos grasos totales (tabla 4). Esto representó un aumento de 2,5 veces en el contenido en DHAn-3 con respecto al control positivo de 4127-línea 150. Se observaron resultados similares en una línea que expresaba la PKS de *Schizochytrium* junto con HetI en combinación con ACS-2 (4127/5724-línea 552) que mostró un aumento de 1,8 veces en el contenido en DHAn-3 en comparación con el control positivo. Además, se observó un desplazamiento en la razón de DHA con respecto a DPA de desde aproximadamente 0,85:1,0 en la generación T2 o 1,0:1,0 en la generación T4 de 4127-línea 150 hasta 1,7:1,0 en la línea ACS-1 y 1,2:1,0 en la línea ACS-2. En todas las semillas transgénicas analizadas, los únicos ácidos grasos novedosos detectados en el perfil fueron DHA n-3 o DPA n-6.

Tabla 4. Niveles de DHA y DPA en semillas de *Arabidopsis* de tipo natural maduras y transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) en comparación con semillas transgénicas que combinan expresión de AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) y con la expresión de ACS-1 o ACS-2 de *Schizochytrium*, en semillas reunidas. Se determinaron el % de DHAn-3 y el % de DPAn-6 tras la separación por CG y la detección FID de los EMAG calculados totales

Estrategia	Genotipo	Línea	Generación	Fenotipo		
				% de DHA (C22:6 n-3)	% de DPA (C22:5 n-6)	% de DHA + DPA
Control negativo	Tipo natural (semillas reunidas)	Ecotipo C24	N/A	0	0	0
Control positivo	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (semillas reunidas)	4127-línea 150	T2	0,6	0,7	1,3
			T4	0,6	0,6	1,2

Expresión de AcilCoAS	OrfA, OrfB*, OrfC, Het1 ACS-1 (semillas reunidas)	4127/5723-línea 514	T4/T2	1,5	0,9	2,4
	OrfA, OrfB*, OrfC, Het1 ACS-2 (semillas reunidas)	4127/5724-línea 552		1,1	0,9	2,0

Ejemplo 13c

5 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con Het1, combinada con inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS II usando interferencia de ARN (iARN).

10 Se usaron plantas derivadas de 4127-línea 150 para la introducción de iARN de KAS II con el intrón (construido 5727) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogieron las semillas y se analizaron para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

15 Como ejemplo, una línea en particular (4127/5727-línea 1097) mostró el 1,3% de DHA n-3 y el 1,2% de DPA n-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 2,5% en el perfil de ácidos grasos totales (tabla 5). Esto representó un aumento de más de 2,1 veces en el contenido en DHA con respecto al control positivo de 4127-línea 150. Posteriormente, se analizaron individualmente semillas individuales de 4127/5727-línea 1097 mediante separación por CG y detección FID de los EMAG calculados totales.

20 Tras este análisis se observó que las semillas dentro de esta población mostraron hasta el 2,0% de DHAn-3 y el 1,6% de DPAn-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 3,6% en el perfil de ácidos grasos (tabla 5). Esto representa un aumento de 3,3 veces en el contenido en DHA y un aumento de 3 veces en el contenido en AGPI de *Schizochytrium* con respecto al control positivo de 4127-línea 150. Además, se observó un desplazamiento en la razón de DHA con respecto a DPA de desde 0,85:1,0 en la generación T2 o 1,0:1,0 en la generación T4 de 4127-línea 150 hasta 1,25:1,0 o mayor en la línea de inhibición de FAS. Este promedio de semilla individual concordaba con la muestra reunida con respecto al % de DHA n-3, al % de DPA n-6 y al % total (DHA + DPA) y las diferencias dentro de esta población pueden atribuirse a la segregación de los loci 4127 y 5727 recombinantes en semillas cotransformadas. En todas las semillas transgénicas analizadas, los únicos ácidos grasos novedosos detectados en el perfil fueron DHA n-3 o DPA n-6.

30 Tabla 5. Niveles de DHA y DPA en semillas de *Arabidopsis* de tipo natural maduras y transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con Het1 (con direccionamiento a plástido) en comparación con semillas transgénicas que combinan expresión de AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con Het1 (con direccionamiento a plástido) con atenuación de KAS II en semillas reunidas e individuales. Se determinaron el % de DHA n-3 y el % de DPA n-6 tras la separación por CG y la detección FID de los EMAG calculados totales.

Estrategia	Genotipo	Línea	Generación	Fenotipo		
				% de DHA (C22:6 n-3)	% de DPA (C22:5 n-6)	% de DHA + DPA
Control negativo	Tipo natural (semillas reunidas)	Ecotipo C24	N/A	0	0	0
Control positivo	OrfA, OrfB*, OrfC, Het1 (semillas reunidas)	4127-línea 150	T2	0,6	0,7	1,3
			T4	0,6	0,6	1,2
Inhibición de FAS	OrfA, OrfB*, OrfC, Het1 iARN de KAS II con el intrón (semillas reunidas)	4127/5723-línea 1097	T4/T2	1,3	1,2	2,5
		1097-7		0,7	0,7	1,4
		1097-9		0,7	0,8	1,5
		1097-2		0,9	0,9	1,8

II con el intrón (semilla individual)	1097-5		1,0	0,9	1,9
	1097-6		1,0	1,1	2,1
	1097-1		1,2	1,3	2,5
	1097-8		1,3	1,3	2,6
	1097-4		1,4	0,8	2,2
	1097-10		1,4	1,2	2,6
	1097-3		2,0	1,6	3,6
	Promedio de semilla individual	T4/T2	1,2	1,0	2,2

Ejemplo 13d

5 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPA n-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS III usando ARN antisentido.

10 Se usaron plantas derivadas de 4127-línea 150 para la introducción del constructo antisentido de KAS III (5129) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogieron las semillas y se analizaron para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

15 Como ejemplo, una línea en particular (4127/5729-línea 1087) mostró el 1,7% de DHA n-3 y el 1,2% de DPA n-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 2,9% en el perfil de ácidos grasos totales (tabla 6). Esto representó un aumento de 2,8 veces en el contenido en DHA con respecto al control positivo de 4127-línea 150.

20 Posteriormente, se analizaron individualmente semillas individuales de 4127/5729-línea 1087 mediante separación por CG y detección FID de los EMAG calculados totales. Tras este análisis se observó que las semillas dentro de esta población mostraron hasta el 2,4% de DHA n-3 y el 1,8% de DPA n-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 4,2% en el perfil de ácidos grasos (tabla 6). Esto representaría un aumento de 4 veces en el contenido en DHA y un aumento de 3,2 veces en el contenido en AGPI de *Schizochytrium* con respecto al control positivo de 4127-línea 150. Además, se observó un desplazamiento en la razón de DHA con respecto a DPA de desde 0,85:1,0 en la generación T2 o 1,0:1,0 en la generación T4 de 4127-línea 150 hasta 1,33:1,0 o mayor en la línea de inhibición de FAS. Este promedio de semilla individual concordaba con la muestra reunida con respecto al % de DHA n-3, el % de DPA n-6 y el % total (DHA + DPA) y las diferencias dentro de esta población pueden atribuirse a la segregación de los loci 4127 y 5729 recombinantes en semillas cotransformadas. En todas las semillas transgénicas analizadas los únicos ácidos grasos novedosos detectados en el perfil fueron DHA n-3 o DPA n-6 tal como se predice a partir de los datos de expresión heteróloga y bioquímicos anteriores observados en *E. coli* y levaduras. El cromatograma de EMAG mediante CG obtenido para el análisis de la muestra de semillas 1087-7 se muestra para referencia en la figura 14.

35 Tabla 6. Niveles de DHA y DPA en semillas de *Arabidopsis* de tipo natural maduras y transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) en comparación con semillas transgénicas que combinan expresión de AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) con atenuación de KAS III en semillas reunidas e individuales. Se determinaron el % de DHA n-3 y el % de DPA n-6 tras la separación por CG y la detección FID de los EMAG calculados totales.

Estrategia	Genotipo	Línea	Generación	Fenotipo		
				% de DHA (C22:6 n-3)	% de DPA (C22:5 n-6)	% de DHA + DPA
Control negativo	Tipo natural (semillas reunidas)	Ecotipo C24	N/A	0	0	0
Control positivo	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (semillas reunidas)	4127-línea 150	T2	0,6	0,7	1,3
			T4	0,6	0,6	1,2
Inhibición de FAS	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, ARN antisentido de KAS III (semillas)	4127/5729-línea 1087	T4/T2	1,7	1,2	2,9

	reunidas)					
	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI ARN antisentido de KAS III (semilla individual)	1087-9		0,9	1,0	1,9
		1087-4		1,0	1,1	2,1
		1087-2		1,1	0,9	2,0
		1087-6		1,2	0,6	1,8
		1087-1		1,3	1,1	2,4
		1087-8		1,4	1,5	2,9
		1087-3		1,7	1,1	2,8
		1087-10		1,8	1,6	3,4
		1087-5		2,0	1,6	3,6
		1087-7		2,4	1,8	4,2
	Promedio de semilla individual	T4/T2	1,5	1,2	2,7	

Ejemplo 13e

5 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada tanto con la expresión del gen de ScACS-1 como con la inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS III usando ARN antisentido.

10 Se usaron plantas derivadas de 4127-línea 150 para la introducción de ScACS-1 más iARN de KAS II usando el constructo 5731 mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogieron las semillas y se analizaron para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

15 Como ejemplo, una línea (4127/5731-línea 1366) mostró el 1,9% de DHA y el 1,9% de DPA n-6 para un contenido en AGPI de *Schizochytrium* combinado del 3,8% en el perfil de ácidos grasos totales (tabla 7). Esto representó un aumento de 3,2 veces con respecto al control positivo de 4127-línea 150, un aumento de 1,3 veces con respecto a la estrategia de ACS-1 sola tal como se observa en 4127/5723-línea 514 y un aumento de 1,5 veces en comparación con la estrategia de atenuación de iARN de KAS II sola tal como se observa en 4127/5727-línea 1097 cuando se compara con el contenido en DHA de poblaciones de semillas reunidas tal como se describe en los ejemplos 13b y 20 13c (tablas 4 y 5), respectivamente.

25 Se esperaba que se observaran niveles superiores de contenido en DHA en semillas individuales dentro de esta población como reflejo de la segregación de los loci 4127 y 5731 entre las semillas reunidas. En todas las semillas transgénicas analizadas los únicos ácidos grasos novedosos detectados en el perfil fueron DHA n-3 o DPA n-6 tal como se predice a partir de los datos de expresión heteróloga y bioquímicos anteriores observados en *E. coli* y levaduras. El cromatograma de EMAG mediante CG obtenido para el análisis de la muestra de semillas reunidas 4127/5731-línea 1366 se muestra para referencia en la figura 15.

30 Tabla 7. Niveles de DHAn-3 y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis* de tipo natural maduras y transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) en comparación con semillas transgénicas que combinan AGPI sintasa de *Schizochytrium* junto con HetI (con direccionamiento a plástido) combinado con la expresión de ACS-1 de *Schizochytrium* e inhibición de FAS, en semillas reunidas. Se determinaron el % de DHA n-3 y el % de DPA n-6 tras la separación por CG y la detección FID de los EMAG calculados totales.

35

Estrategia	Genotipo	Línea	Generación	Fenotipo		
				% de DHA (C22:6 n-3)	% de DPA (C22:5 n-6)	% de DHA + DPA
Control negativo	Tipo natural (semillas reunidas)	Ecotipo C24	N/A	0	0	0
Control positivo	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (semillas reunidas)	4127-línea 150	T2	0,6	0,7	1,3
			T4	0,6	0,6	1,2

Expresión de AcilCoAS e inhibición de FAS	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, ACS-1, iARN de KAS II (semillas reunidas)	4127/5721-línea 1366	T4/T2	1,9	1,9	3,8
---	--	----------------------	-------	-----	-----	-----

Ejemplo 13f

5 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con la expresión de la LPAAT de *Schizochytrium*.

10 Se usaron plantas derivadas de 4127-línea 150 para la introducción del constructo de LPAAT (5725) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogerán las semillas y se analizarán para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

15 Se espera que las semillas de estas plantas produzcan los AGPI objetivo (DHA y DPAn-6). También se espera que los niveles de producción de DHA y/o DPAn-6 aumenten en comparación con la planta que expresa PKS de AGPI en ausencia del constructo de LPAAT añadido.

Ejemplo 13g

20 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con la expresión de la DAGAT y la ACS-1 de *Schizochytrium*, e inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS II usando iARN o la atenuación de KASIII usando molécula antisentido.

25 Se usaron plantas derivadas de 5731 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante iARN de KASII combinadas) para la introducción del constructo de DAGAT (4793) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. También se produjeron plantas similares en la referencia 5734 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante molécula antisentido de KASIII combinadas). Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogerán las semillas y se analizarán para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

30 Se espera que las semillas de estas plantas produzcan los AGPI objetivo (DHA y DPAn-6). También se espera que los niveles de producción de DHA y/o DPAn-6 aumenten en comparación con la planta que expresa PKS de AGPI en ausencia del constructo de DAGAT añadido e inhibición de FAS.

Ejemplo 13h

40 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con la expresión de la DAGAT y la ACS-8 de *Schizochytrium*, combinada adicionalmente con la expresión de la ACS-1 de *Schizochytrium* e inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS II usando iARN o la atenuación de KASIII usando molécula antisentido.

45 Se usaron plantas derivadas de 5731 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante iARN de KASII combinadas) para la introducción del constructo de DAGAT/ACS-8 (4794) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. También se produjeron plantas similares en la referencia 5734 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante antisentido de KASIII combinadas). Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogerán las semillas y se analizarán para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

50 Se espera que las semillas de estas plantas produzcan los AGPI objetivo (DHA y DPAn-6). También se espera que los niveles de producción de DHA y/o DPAn-6 aumenten en comparación con la planta que expresa PKS de AGPI en ausencia del constructo de DAGAT/ACS-8 añadido, el constructo de ACS-1 e inhibición de FAS.

Ejemplo 13i

60 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con la expresión de la

LPAAT de *Schizochytrium* y la DAGAT de *Schizochytrium*, combinada adicionalmente con la expresión de la ACS-1 de *Schizochytrium* e inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS II usando iARN o la atenuación de KASIII usando molécula antisentido.

- 5 Se usaron plantas derivadas de 5731 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante iARN de KASII combinadas) para la introducción del constructo de DAGAT/LPAAT (4795) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. También se produjeron plantas similares en la referencia 5734 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante molécula antisentido de KASIII combinadas). Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogerán las semillas y se
10 analizarán para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

- Se espera que las semillas de estas plantas produzcan los AGPI objetivo (DHA y DPAn-6). También se espera que los niveles de producción de DHA y/o DPAn-6 aumenten en comparación con la planta que expresa PKS de AGPI
15 en ausencia del constructo de DAGAT/LPAAT añadido, el constructo de ACS-1 e inhibición de FAS.

Ejemplo 13j

- 20 Este ejemplo describe la producción de DHA y DPAn-6 en semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas que expresan la AGPI sintasa de *Schizochytrium* (OrfA, OrfB* y OrfC) junto con HetI, combinada con la expresión de la LPAAT de *Schizochytrium*, la DAGAT de *Schizochytrium* y la ACS-8 de *Schizochytrium*, combinada adicionalmente con la expresión de la ACS-1 de *Schizochytrium* e inhibición de FAS a través de la atenuación de KAS II usando iARN o la atenuación de KASIII usando molécula antisentido.

- 25 Se usaron plantas derivadas de 5731 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante iARN de KASII combinadas) para la introducción del constructo de DAGAT/LPAAT/ACS-8 (4796) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* tal como se describió anteriormente. También se produjeron plantas similares en la referencia 5734 (expresión de ACS-1 e inhibición de FAS mediante molécula antisentido de KASIII combinadas). Tras la selección de plantas recombinantes en presencia tanto de fosfotricina como de manosa, se recogerán las semillas
30 y se analizarán para determinar los perfiles de ácidos grasos mediante separación por CG y detección FID de EMAG preparados a partir de las semillas reunidas.

- Se espera que las semillas de estas plantas produzcan los AGPI objetivo (DHA y DPAn-6). También se espera que los niveles de producción de DHA y/o DPAn-6 aumenten en comparación con la planta que expresa PKS de AGPI
35 en ausencia del constructo de DAGAT/LPAAT/ACS-8 añadido, el constructo de ACS-1 e inhibición de FAS.

- La descripción completa de cada una de la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/784.616 y la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 60/783.205, presentada el 15 de marzo de 2006, se incorpora
40 en el presente documento como referencia.

- Aunque se han descrito en detalle diversas realizaciones de la presente invención, resulta evidente que a los expertos en la técnica se les ocurrirán modificaciones y adaptaciones de esas realizaciones. Sin embargo, debe entenderse expresamente que tales modificaciones y adaptaciones se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que es idéntica en al menos el 75% a una ACoAS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.
2. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que es idéntica en al menos el 85% a una ACoAS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.
3. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que es idéntica en al menos el 95% a una ACoAS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.
4. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica para una acil-CoA sintetasa (ACoAS) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.
5. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO: 82.
6. Proteína aislada codificada por la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, operativamente unida a una secuencia de control de la expresión.
8. Célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 7.
9. Célula huésped recombinante según la reivindicación 8, en la que la célula huésped es un microorganismo o una célula vegetal.
10. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente, en donde el microorganismo o la planta se ha modificado genéticamente para expresar la molécula de ácido nucleico aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
11. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 10, en donde el microorganismo o la planta expresa una AGPI sintasa que produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) y una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa).
12. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 11, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de un organismo que expresa de manera endógena una AGPI sintasa.
13. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 11, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de *Cryptocodinium cohnii*, en donde la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.
14. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 11, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de un microorganismo de Thraustochytriales, en el que la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.
15. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 11, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda acil-CoA sintetasa (ACoAS) o un homólogo de la misma de *Schizochytrium*, en donde la ACoAS u homólogo de la misma cataliza la conversión de ácidos grasos libres (AGL) de AGPI de cadena larga en acil-CoA.
16. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 11, en donde el microorganismo o la planta contiene una modificación genética adicional para delecionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el microorganismo o la planta.

- 5 17. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde el microorganismo o la planta contiene una modificación genética adicional para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.
- 10 18. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en donde el microorganismo o la planta contiene una modificación genética adicional para expresar una o más proteínas heterólogas a partir de un organismo que produce de manera endógena AGPI, en donde la proteína utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).
- 15 19. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 18, en donde la proteína es una DAGAT o una LPAAT.
- 20 20. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 18, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de un traustozoutridio o un laberintúlido que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).
- 25 21. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según la reivindicación 18, en donde el microorganismo o la planta se transforma con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de *Schizochytrium* que utiliza AGPI-CoA como sustratos en la formación de fosfolípidos (PL) o triacilgliceroles (TAG).
- 30 22. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un traustozoutridio o un laberintúlido.
- 35 23. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un microorganismo de Thraustochytriales.
- 40 24. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un organismo seleccionado del grupo que consiste en: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia* y *Labyrinthula*.
- 45 25. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de *Schizochytrium*.
- 50 26. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Schizochytrium* sp., n.º de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) 20888, *Thraustochytrium* 23B, n.º de la ATCC 20892, y un mutante de cualquiera de dichos microorganismos.
- 55 27. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, en donde la AGPI sintasa comprende al menos un dominio funcional de una AGPI sintasa de una bacteria marina.
- 60 28. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 27, en donde el microorganismo o la planta produce al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) seleccionado del grupo que consiste en: EPA (C20:5, n-3), DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6) y/o SDA (C18:4, n-3).
- 65 29. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 27, en donde el microorganismo o la planta produce DHA y DPA n-6 o en donde el microorganismo o la planta produce ARA.
30. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 29, en donde el microorganismo o la planta es un microorganismo.
31. Microorganismo modificado genéticamente o planta modificada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 27, en donde el microorganismo o la planta es una planta o una célula vegetal.
32. Semilla obtenida de la planta según la reivindicación 31.

33. Producto alimenticio que contiene la semilla según la reivindicación 32.

5 34. Procedimiento para transformar un organismo para que exprese AGPI, que comprende transformar un organismo con moléculas de ácido nucleico que codifican para una AGPI sintasa, con una molécula de ácido nucleico que codifica para una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y con al menos una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10 35. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que el organismo contiene una modificación genética para delecionar o inactivar una ácido graso sintasa (FAS) expresada por el organismo.

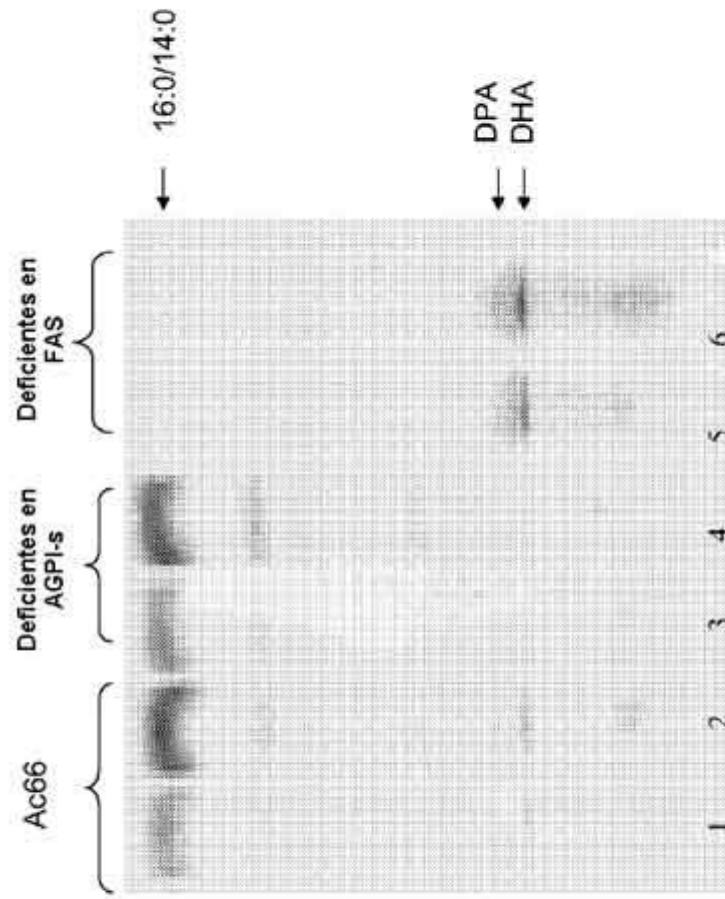
36. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que el organismo contiene una modificación genética para reducir la competición por malonil CoA con la AGPI sintasa o para aumentar el nivel de malonil CoA en el organismo.

15 37. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que el organismo es una planta.

38. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que el organismo es un microorganismo.

20 39. Método para producir un aceite que comprende al menos una AGPI, que comprende recuperar un aceite de un organismo modificado genéticamente para que exprese una molécula de ácido nucleico que codifica para una AGPI sintasa, una molécula de ácido nucleico que codifica para una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y al menos una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

FIG. 1.



Análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de ensayos de actividad *in vitro* de homogeneizados libres de células de la cepa de *Schizochytrium* Ac66 y mutantes deficientes en AGPI-S y deficientes en FAS derivados de esa cepa. Los ensayos se ejecutaron durante 30 minutos, se prepararon los EMAG y se extrajeron usando el protocolo ácido y se separaron mediante CCF con plata.

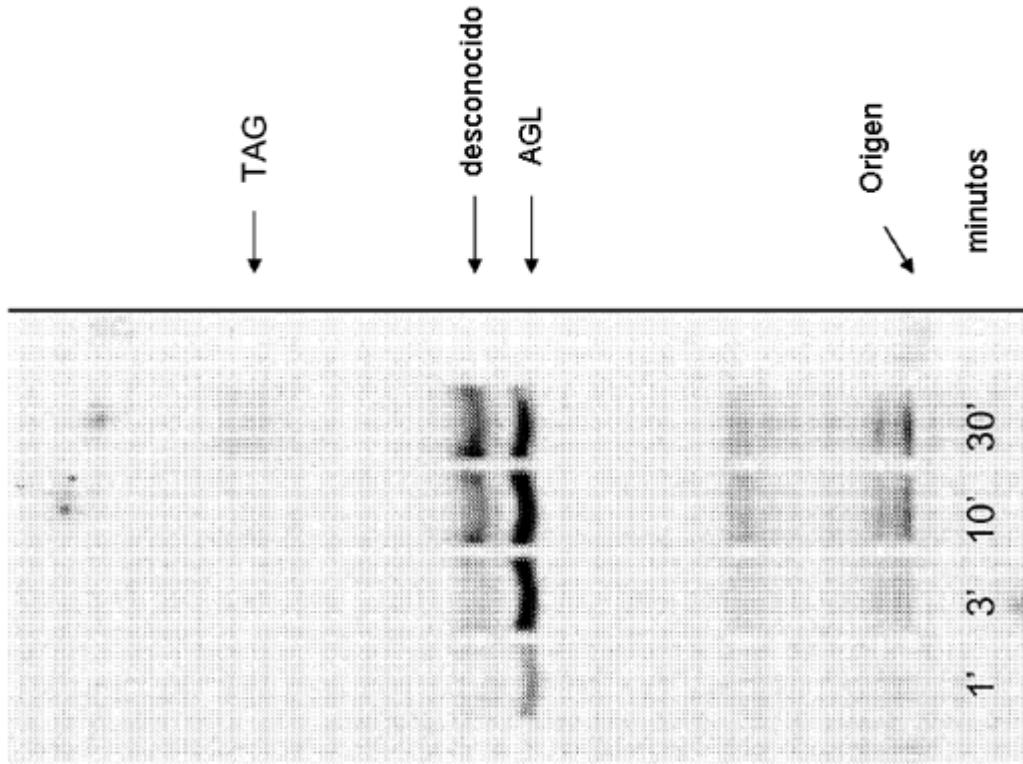
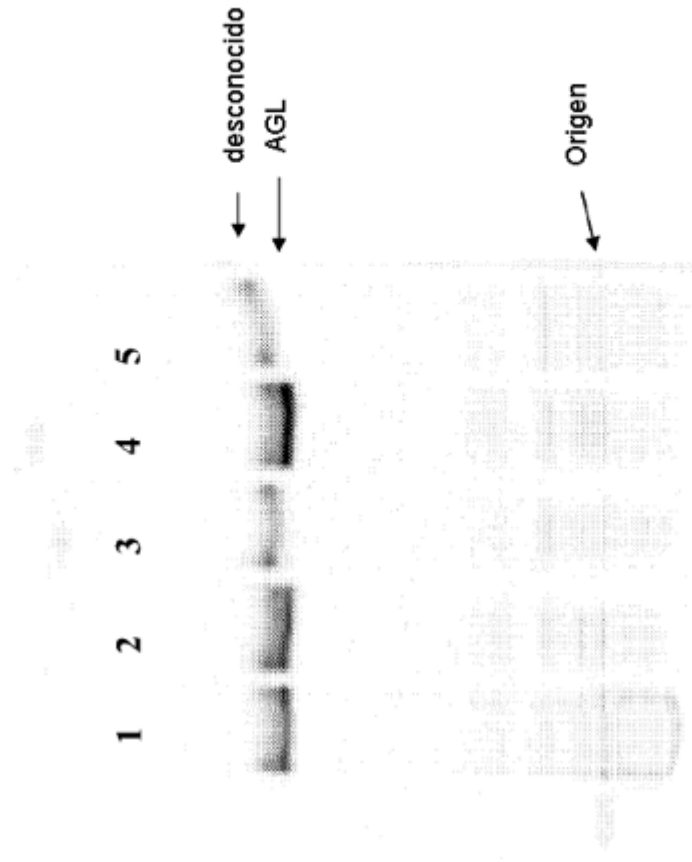


FIG. 2

Análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* en la cepa deficiente en FAS. Se ejecutaron las reacciones durante los tiempos indicados y se extrajeron los lípidos usando el protocolo de HIP.

FIG. 3



Análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS. Se usaron componentes de ensayo convencionales pero se variaron los componentes de NADH, NADPH y acetyl-CoA. La inclusión de estos componentes es la siguiente: Carril 1 - NADH/ NADPH/acetyl-CoA, 2 - NADPH/acetyl-CoA, 3 - NADH/acetyl-CoA, 4 - NADH/NADPH, 5 - nada).

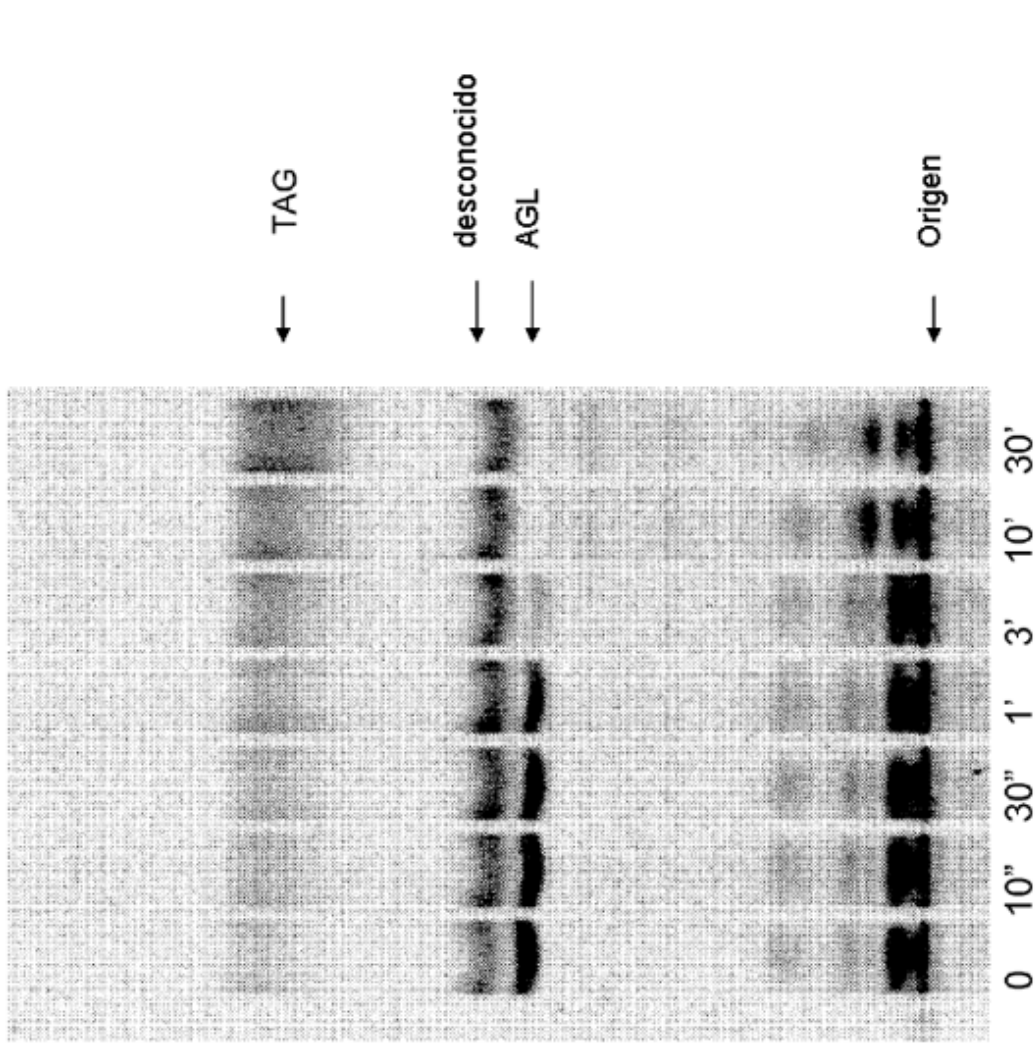
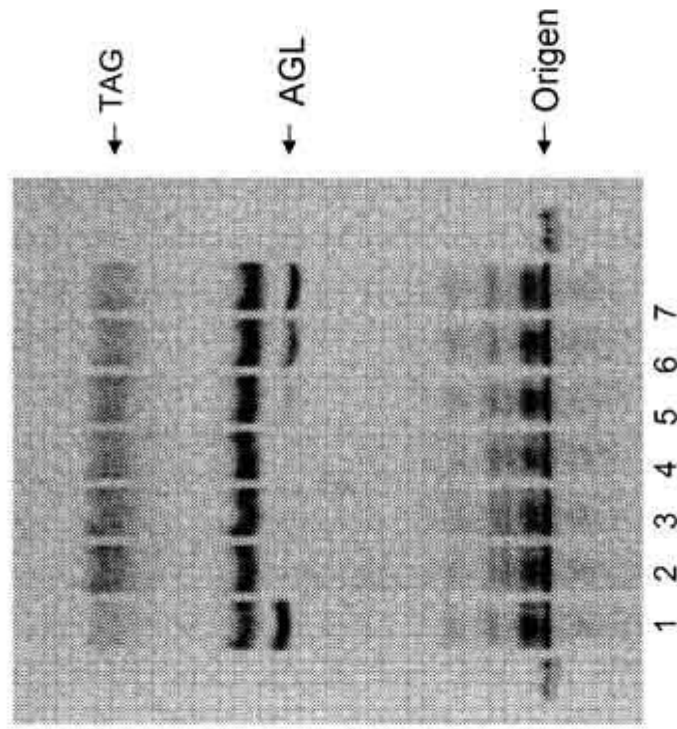


FIG. 4

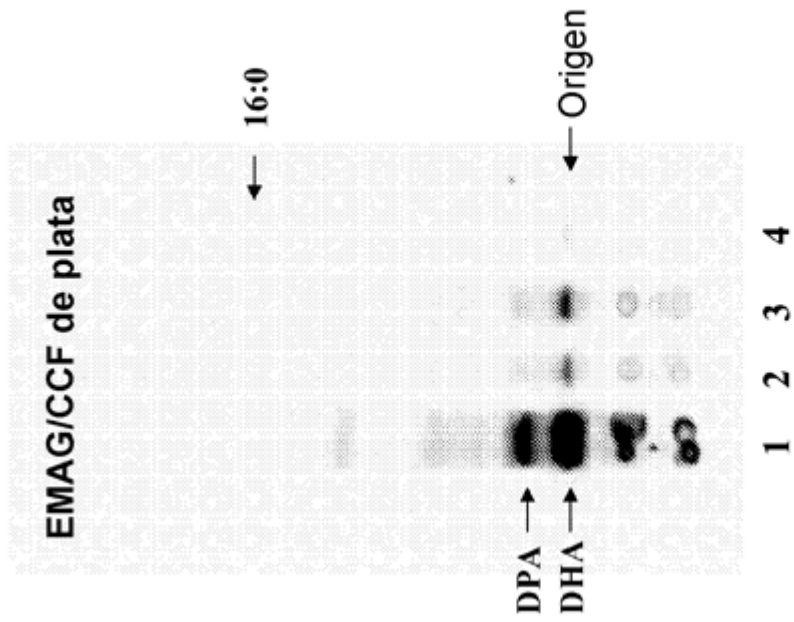
Análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS. Se ejecutaron las reacciones durante 10 minutos, luego se añadieron ATP y Mg+2. Se detuvieron las reacciones a los tiempos indicados en la parte inferior ("= s, '= min) y se extrajeron los lípidos usando el protocolo de HLP.

FIG. 5



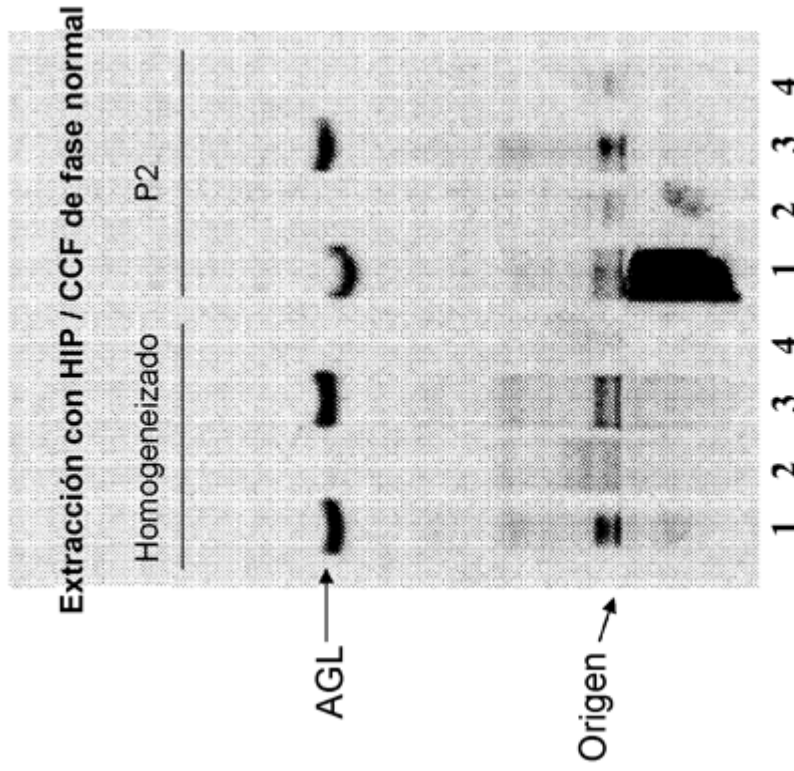
Análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de separaciones de CCF de fase normal de ensayos de actividad *in vitro* de la cepa deficiente en FAS. Se ejecutaron las reacciones durante 10 minutos, se añadieron ATP y Mg+2 (excepto en la muestra 1) y las incubaciones continuaron durante 20 min adicionales. Además, las siguientes muestras contenían: 3 - 2 ul de DMSO, 4 - 4 ul de DMSO, 5 - triascina C 25 uM, 6 - triascina C 100 uM, 7 - triascina C 200 uM. Se añadió triascina C a partir de una disolución concentrada en DMSO. Se detuvieron las reacciones y se extrajeron los lípidos usando el protocolo de HIP.

FIG. 6A



1. Homogeneizado
2. S1 (5k x g x 5 min)
3. P2 (100k x g x 1 h)
4. S2 (100k x g x 1h)

FIG. 6B



1. NADPH
2. NADH
3. NADPH / NADH
4. Agua

FIG. 7

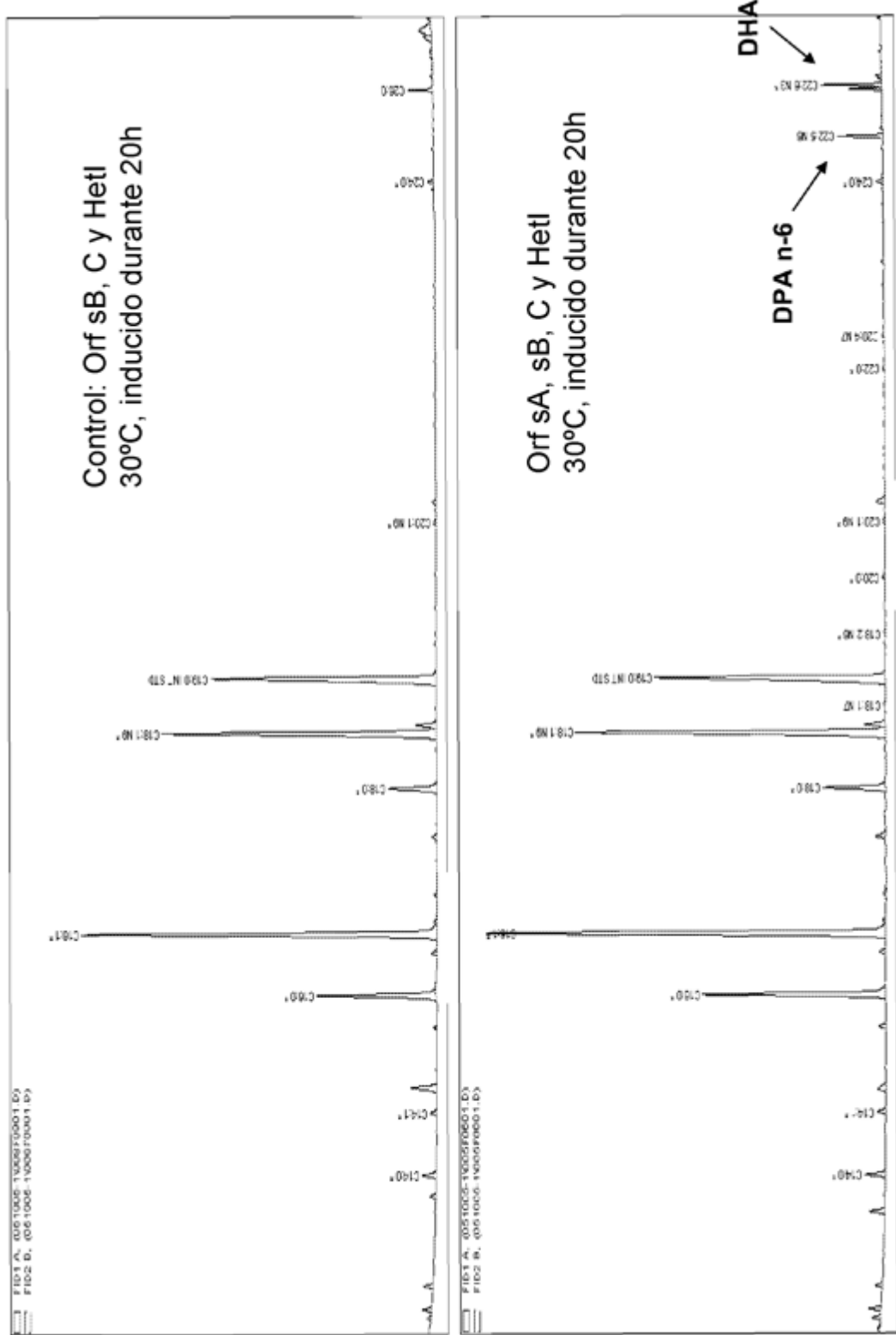


FIG. 8

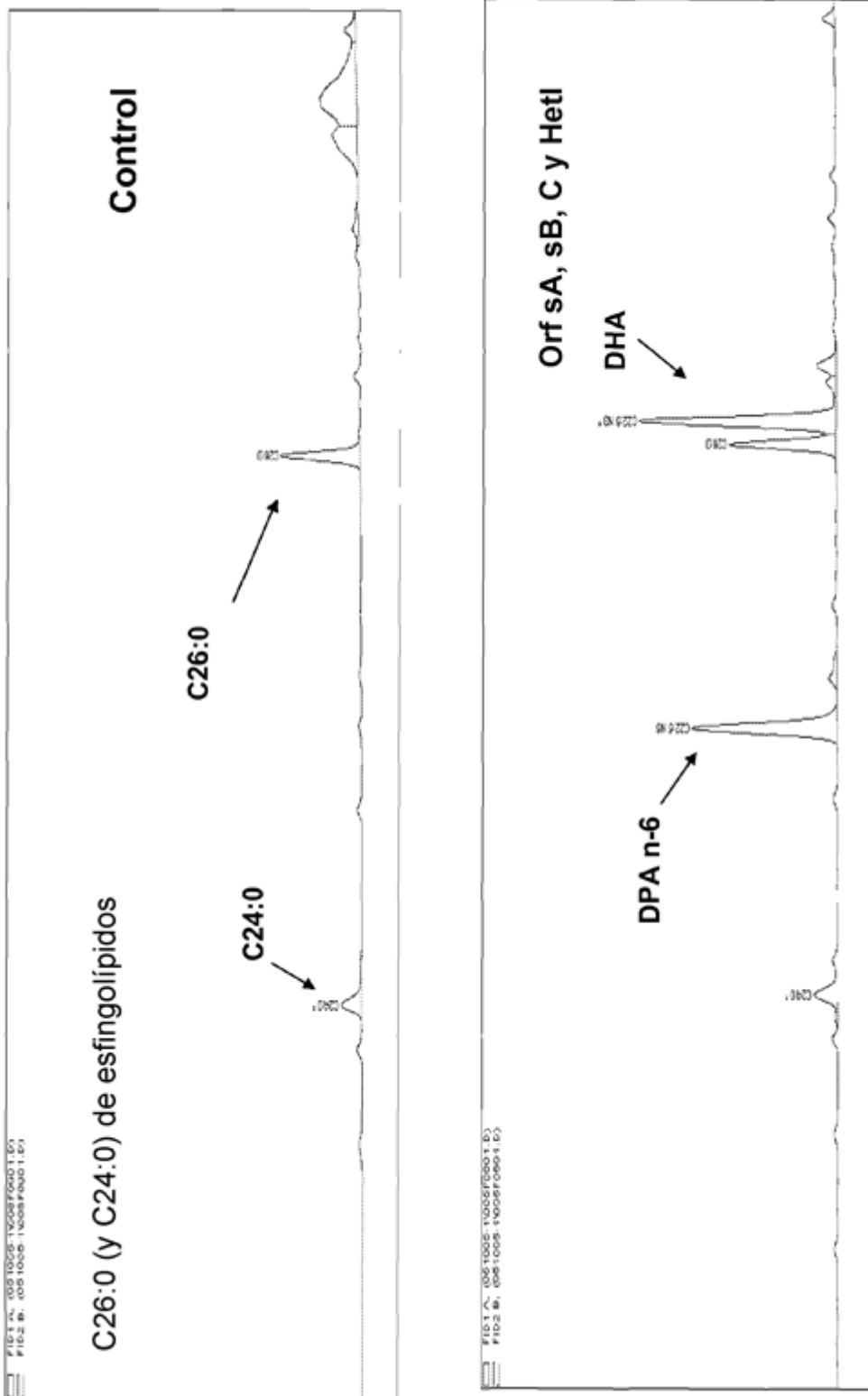


FIG. 9

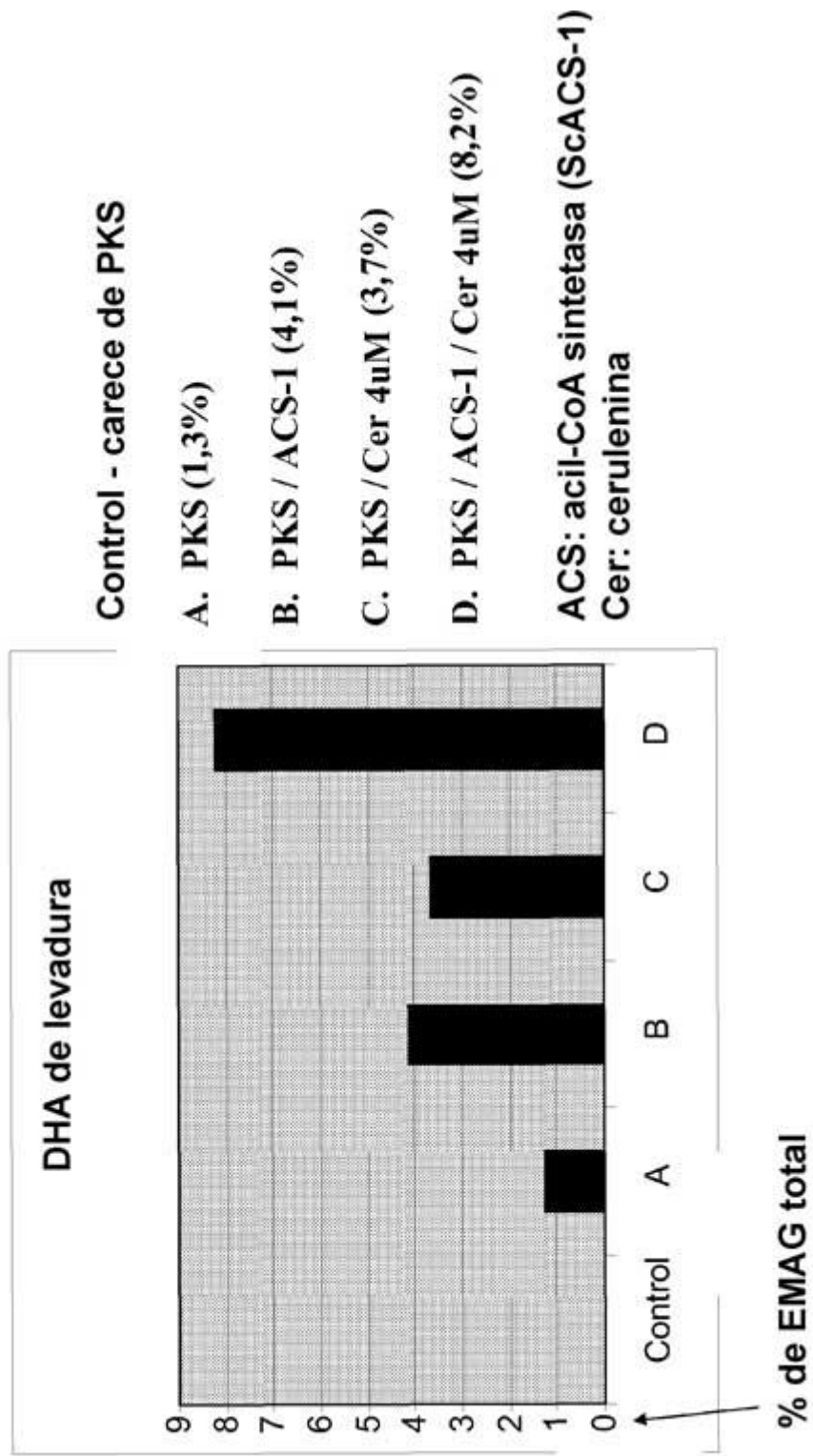


FIG. 10

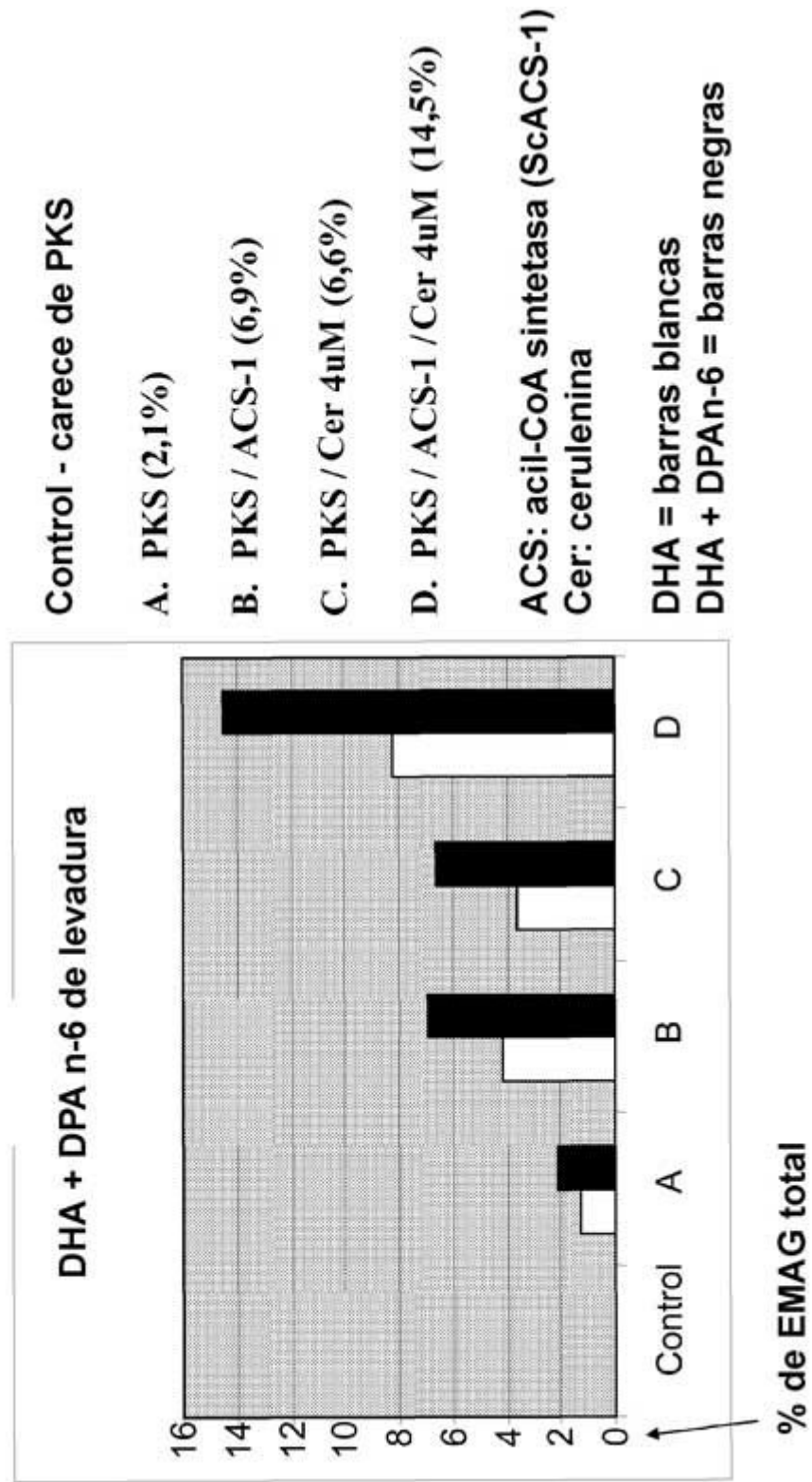


FIG. 11

Levadura: PKS / ACS-1 / cerulenina 4 mM

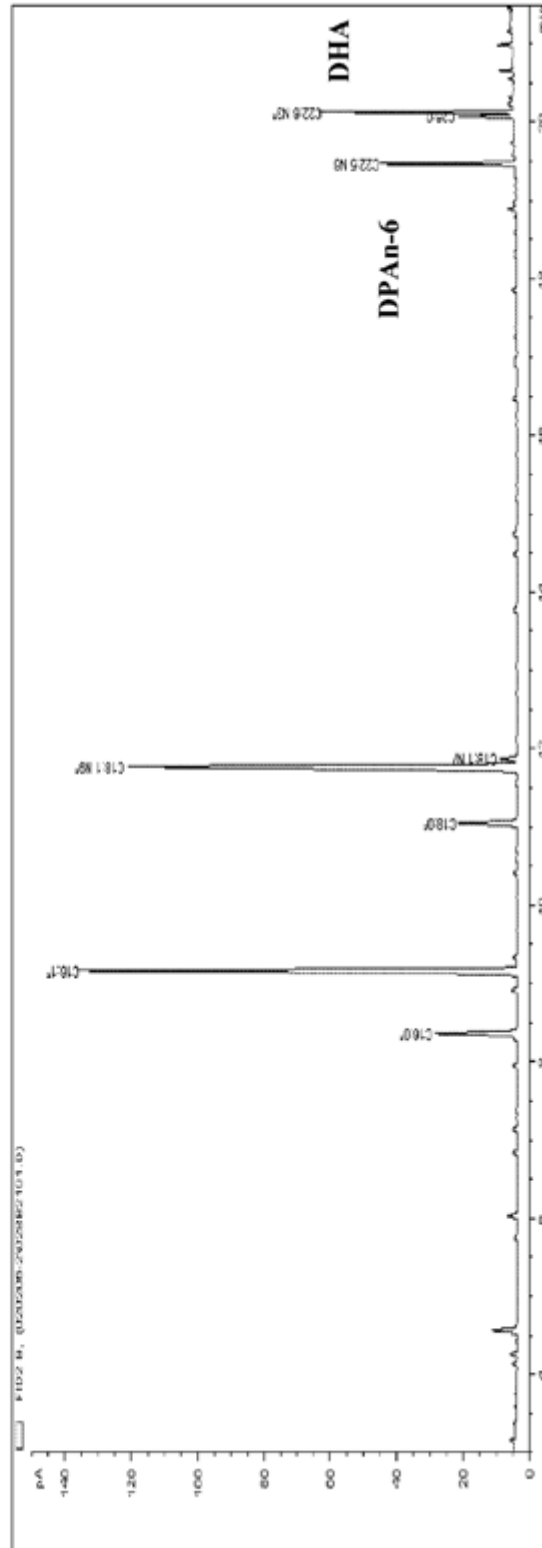
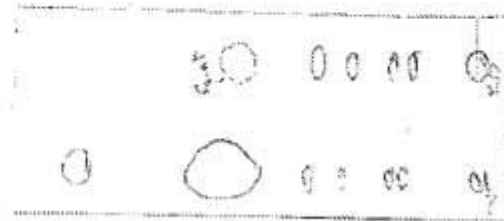


FIG. 12

CCF / Tinción con yodo - extractos de lípidos



Perfil de clase de lípidos

ID de muestra	TN	Deficiente
Hidrocarburos, por ejemplo escualeno	ND	7,8
Ésteres de esteroi	2,6	ND
Triglicéridos	56,5	4,0
AGL	ND	0,8
Diglicéridos	2,2	6,8
Fosfolípidos	17,7	42,3
Recuperación total	79,0	61,7

Notificado en porcentaje = (peso de clase de lípidos específica / peso de muestra total) x 100

ND = ninguno detectado, por debajo de los límites de detección

FIG. 13

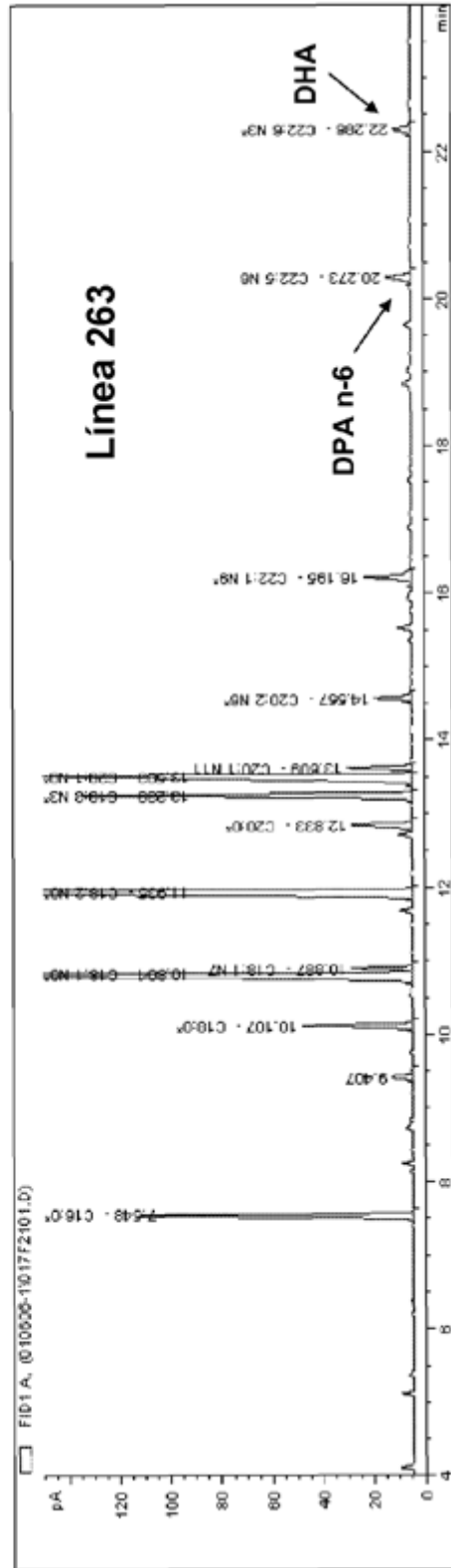
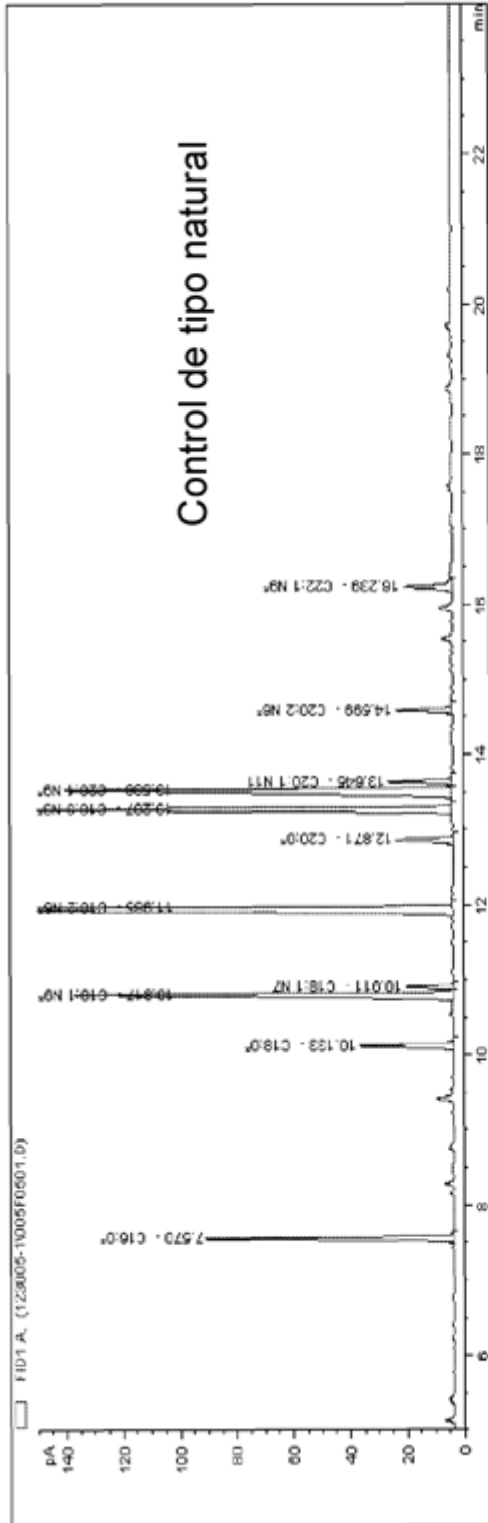


FIG. 14

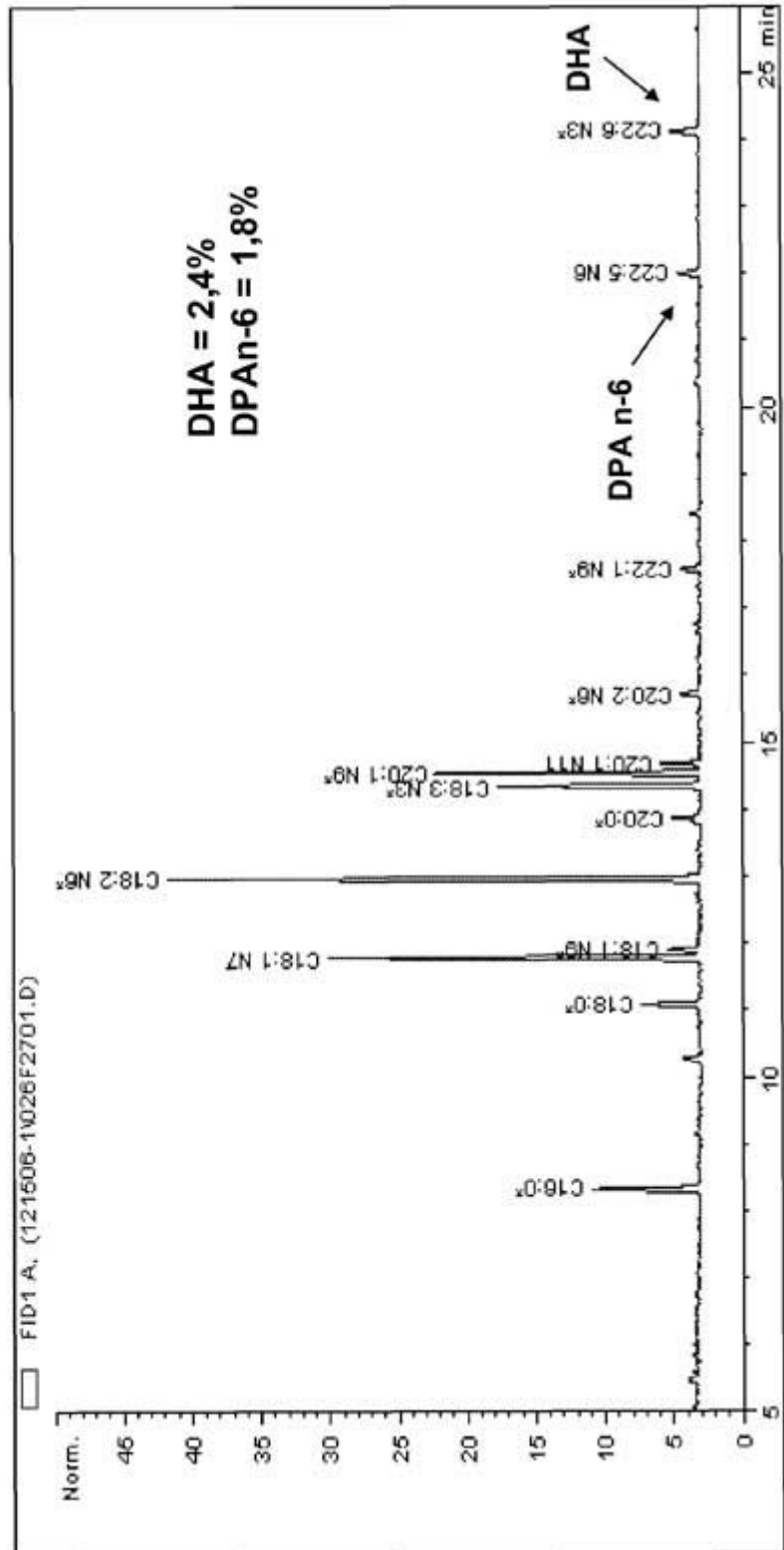


FIG. 15

