

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 383**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009 E 09709170 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2250270**

54 Título: **Procedimiento de integración localizada de múltiples copias de un gen de interés en una cepa de Yarrowia**

30 Prioridad:

**05.02.2008 FR 0850736**

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

**09.12.2015**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (100.0%)  
147 Rue de l'Université  
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**NICAUD, JEAN-MARC;  
FUDALEJ, FRANCK;  
NEUVEGLISE, CÉCILE y  
BECKERICH, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 553 383 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

Procedimiento de integración localizada de múltiples copias de un gen de interés en una cepa de *Yarrowia*.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de integración localizada de por lo menos tres copias de un gen de interés en el genoma de una cepa de *Yarrowia* que comprende las etapas de (a) poner en cultivo una cepa de *Yarrowia*, comprendiendo dicha cepa una delección de entre por lo menos tres delecciones seleccionadas de entre Ura 3-302, Leu 2-270, Gut 2-744 y Ade 2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas delecciones a una auxotrofia para dicha cepa, independientemente el uno del otro de los por lo menos tres genes; (b) transformación de dicha cepa de *Yarrowia* así obtenida con por lo menos tres vectores recombinantes que comprenden unos marcadores de selección que permiten, para dicha cepa de *Yarrowia*, la complementación de la auxotrofia resultante de cada una de dichas delecciones; y (c) selección sobre un medio mínimo, de las levaduras que han integrado dichos por lo menos tres vectores recombinantes. La presente invención comprende también un procedimiento de producción de polipéptido de interés que utiliza un procedimiento de este tipo así como un procedimiento de obtención de cepa de *Yarrowia* modificada que comprende una delección de entre por lo menos tres genes, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas delecciones a una auxotrofia o a un carácter dominante para dicha cepa.

20 La levadura *Yarrowia lipolytica* se emplea cada vez más en la actualidad como huésped de expresión de genes de interés. Esta levadura presenta, en efecto, la especificidad de producir y segregar con una gran eficacia en el medio de cultivo unas proteínas de alto peso molecular, como las proteasas alcalinas, las proteasas ácidas o la ARNasa, pudiendo dichas proteínas entonces ser fácilmente recuperadas a partir del medio de cultivo. Para permitir la expresión de estos genes de interés, se han desarrollado precozmente diferentes tecnologías como las descritas en particular en la patente EP 0 138 508 B1 o EP 0 220 864 B1. Estas diferentes tecnologías tienen en común utilizar unos vectores denominados "integrativos" que permiten la inserción de un segmento de ADN que lleva el gen de interés en el ADN cromosómico, expresándose a continuación dicho gen de interés. Por tanto, ninguna de estas tecnologías ha podido satisfacer completamente los imperativos de la producción industrial, a saber un rendimiento y una estabilidad en el tiempo importantes. Para satisfacer mejor estos imperativos industriales, se han desarrollado nuevas tecnologías.

30 Así, la solicitud PCT WO 00/12729 describe una tecnología que utiliza unos vectores integrativos que comprenden una secuencia de interés flanqueada de secuencias zeta que corresponden a los LTR del retrotransposón YIt1 de *Yarrowia lipolytica*. Estos vectores integrativos, cuando se utilizan en cepas de *Yarrowia lipolytica* desprovistas de secuencia zeta, permiten unas integraciones de múltiples copias y aleatorias en el genoma de dichas cepas. Esta tecnología particular se ha utilizado particularmente para la producción de la lipasa extracelular resistente a los ácidos LIP2 (véase la solicitud PCT WO 01/83773).

40 Sin embargo, pareció que las cepas de *Yarrowia lipolytica* transformadas por LIP2 presentaban para la mayoría de ellas una estabilidad genética mediocre, generalmente inferior al 50%. Además, siendo estas cepas transformadas obtenidas tras eventos de integración aleatorios, el seguimiento de la estabilidad genética de las cepas por secuenciación de los sitios de inserción es extremadamente fastidioso.

45 A estos problemas de estabilidad de las cepas obtenidas y de dificultad de identificar el sitio de integración preciso de la secuencia exógena se añaden unas dificultades complementarias asociadas a la ausencia de cepas de *Yarrowia lipolytica* deficientes para múltiples marcadores de selección debido a la inestabilidad de estas cepas.

50 Entre los métodos de integración de casetes de expresión, se pueden citar los que utilizan los métodos de transformación homóloga, pero estos últimos utilizan poco marcador (LEU2, URA3, LYS5) y pocas cepas multimarcadas y con unas delecciones que permiten una fuerte disminución de los porcentajes de conversión. Las cepas tienen frecuentemente unos marcadores genómicos que corresponden a unas mutaciones y poco marcador que corresponde a las delecciones. Los únicos marcadores genómicos conocidos con unas delecciones son: ura3-302 (delección de 695 pb), ura3-41 (delección de 41 pb), leu2-270 (delección Stul de 681 pb). MADZAK *et al.* (J. of Biotech., vol. 109, p:63-81, 2004) describe así los marcadores ura3-302 y leu2-270.

55 Entre los vectores se pueden citar los que permiten una integración localizada, pero integrando la parte plasmídica (es decir, integración de los plásmidos a una plataforma pbR322 Madzak *et al.*, Fems yeast research, vol. 5, p: 635-646, 2005) o zeta (Bordes *et al.*, J Microbiol Methods Vol. 70, p. 493-502, 2007). Existen unos vectores de autoclonación para la integración y la amplificación. Pero son dispersos y aleatorios.

60 Para la producción de proteína terapéutica, no es necesario ADN plasmídico y se necesita una integración localizada para identificar la inserción y verificar su secuencia. Se necesita también poder aumentar el número de copias del gen para aumentar la expresión.

65 Los inventores han concebido un método que permite una integración localizada gracias a unos "vectores de integración" que se han construido para liberar el casete de integración (sitio raro 1) y eliminar la parte vector, que tiene unos sitios raros para introducir los marcadores de selección rápidamente (sitio raro 2) y para clonar los

casetes de expresión (sitio raro 3). Unas combinaciones de vectores de integración con diferente combinación de locus/marcador.

Los inventores también:

- han optimizado unas condiciones de transformación para aumentar las tasas de transformación, en particular para los marcadores ADE2 y GUT2; y
- han realizado la asociación de la integración y de un fenotipo para identificar rápidamente los clones interesantes que han integrado en el locus deseado los casetes de integración.

Así, los inventores han realizado en la presente memoria un método de integración de un casete de expresión en un locus que permite introducir al mismo tiempo un nuevo marcador de selección (por ejemplo, nuevo marcador genómico, nueva auxotofía) para permitir una nueva integración con un nuevo casete de integración que posee el marcador de selección correspondiente.

Debido a la posibilidad de buena eficacia de transformación, de bajas tasas de conversión, de cribado de identificación de las inserciones (lipasa para LIP2, marrón para ADE2, SUC- para URA3), es posible realizar así la cointegración (transformar con dos casetes de integración). Esto permite disminuir el tiempo necesario para la obtención de la cepa de producción. Asimismo, la inserción en sitios definidos permite una caracterización rápida de las cepas de producción, siendo la cepa final protótrofa.

La cepa final ya no expresa las proteínas principales segregadas (proteasa AEP, lipasa Lip2p), presenta unas delecciones estables, una baja lisis celular y un sobrenadante limpio (pocas proteínas segregadas).

Los inventores han puesto en evidencia también la posibilidad de obtener con estos marcadores escindibles, permitiendo la escisión general de los marcadores regenerar los marcadores y así poder integrar de nuevo nuevas copias.

Para la obtención de cepas multi-marcadas, se puede introducir un marcador genómico mediante diferentes métodos.

Por ejemplo, el método denominado POP IN/POP OUT utilizado en *Yarrowia lipolytica* para la construcción de los marcadores leu2-270, ura3-302 y xpr2-322 descritos en la revista de G. Barth *et al.*: *Yarrowia lipolytica*. En: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook* (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, pp. 313-388. Springer-Verlag. Consiste en integrar un vector que posee una delección del gen en el locus y después en seleccionar la escisión de este vector e identificar un clon que, por recombinación, ha eliminado el gen salvaje y conservado el gen mutado. Es un método largo, poco eficaz y que necesita también la utilización de un marcador que permita una contra-selección. Por ejemplo, la contra-selección de los clones Ura+ con 5FOA. Esta contra-selección puede introducir unas mutaciones secundarias.

Se puede utilizar asimismo el método SEP (Maftahi M., Nicaud J-M., Gaillardin C., 1996. Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, vol. 12, p. 859-868) que se adaptó en *Yarrowia lipolytica* para la interrupción sucesiva de los genes POX (Wang H. J., Le Dall M-T, Waché Y, Belin J-M, Gaillardin C, Nicaud J-M, 1999. Evaluation of Acyl CoA oxidase (Aox) isozymes function in the n-alkanes-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.*, vol. 181, p. 5140-5148). Este método es más rápido, pero necesita todavía la utilización de un marcador que permita una contra-selección.

Se puede utilizar asimismo el método SEP/cre desarrollado por Fickers *et al.* (Fickers P., Le Dall M.T., Gaillardin C. Thonart P. Nicaud J-M., New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods* vol. 55, p. 727-737, 2003). Es un método rápido y que no necesita la utilización de un marcador que permita una contra-selección. Este método consiste en 1) seleccionar el gen de interés que se quiere eliminar, 2) construir un casete de interrupción por PCR ("Polymerase Chain Reaction") o por clonación, 3) introducir un marcador de selección que contenga a uno y otro lado una secuencia de recombinación (ventajosamente una secuencia loxP o loxR o derivada) que permita una recombinación entre sí para la eliminación del marcador (ventajosamente una secuencia de tipo loxP que permita la recombinación bajo la acción de la recombinasa cre), 4) seleccionar las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes) y verificar la interrupción, 5) transformar con un vector que permita la expresión de la recombinasa (ventajosamente la recombinasa cre que permita la recombinación de las secuencias loxP/loxR y la eliminación del marcador), 6) el aislamiento de un clon que presente la delección del gen de interés y que haya perdido el plásmido de expresión de la recombinasa. Pero se necesita optimizar las delecciones y los marcadores con el fin de minimizar las conversiones génicas durante la transformación.

De lo anterior se desprende que no existen tecnologías de transformación que permitan integrar, de manera localizada y estable en el genoma de *Yarrowia lipolytica*, la secuencia de un gen de interés con el fin de obtener una expresión importante de éste.

Los inventores han puesto en evidencia ahora que la estabilidad de las cepas de *Yarrowia* obtenidas por transformación dependía en gran medida del número de copias integradas. Así, una cepa que presenta 8 copias integradas del gen LIP2 presenta el 70% de estabilidad, elevándose dicha estabilidad al 98% para 7 copias y al 100% para 6 copias.

Asimismo, los inventores han conseguido desarrollar nuevas cepas viables de *Yarrowia lipolytica* que presentan una auxotrofia y, llegado el caso, un carácter dominante asociado a por lo menos tres marcadores de selección distintos, en particular seleccionados de entre los marcadores de selección Ura3, Leu2, Gut2 y Ade2. Las cepas desarrolladas y viables presentan además amplias deleciones (Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-884), en particular con las nuevas deleciones Gut2-744 y Ade2-844, permitiendo dichas deleciones limitar considerablemente la frecuencia de conversión génica (véanse los ejemplos).

La utilización de unas cepas de este tipo en procedimientos de integración, en particular localizada, permite obtener mucho más rápida y simplemente unas cepas transformadas que comprendan múltiples integraciones de un gen de interés.

Finalmente, los inventores han podido desarrollar un nuevo procedimiento de transformación de cepas de *Yarrowia lipolytica* que permite obtener unas cepas transformadas estables y que presentan un nivel interesante de producción de un polipéptido de interés.

### Objetivo de la invención

El objetivo de la invención es remediar los inconvenientes de la técnica anterior y obtener rápidamente unas cepas sobreproductoras de un gen o de genes de interés para la producción de proteínas heterólogas y poder rápidamente verificar los casetes de expresión y caracterizar la cepa de producción.

Se utilizan como microorganismos unas cepas que poseen unos marcadores de selección que permiten un nivel bajo de conversión y una gran eficacia de transformación.

Se utiliza un conjunto de vectores que permite la construcción de vectores que contengan los casetes de expresión y de vectores que contengan los casetes de integración.

Se utilizan asimismo unos métodos rápidos de identificación de los transformantes que contienen la integración de los casetes de integración en los locus definidos.

Finalmente, el método según la invención permite la producción de una proteína heteróloga.

De manera más detallada, la invención propone un conjunto de cepas, de vectores, de marcadores de selección, de ensayos de fenotipo y de caracterización de la inserción de los casetes de inserción para la obtención rápida de las cepas sobreproductoras de un gen o de genes de interés para la producción de proteínas heterólogas, y poder verificar rápidamente los casetes de expresión y caracterizar la cepa de producción que comprende:

- (a) unas cepas receptoras que contienen unas deleciones de genes que confieren una auxotrofia o un defecto de crecimiento en algunos medios;
- (b) un conjunto de vectores de clonación que permiten la construcción de "vectores de expresión" que contienen los casetes de expresión; y un conjunto de "vectores de integración" que permite la construcción de vectores de integración;
- (c) unos métodos de obtención de los transformantes, de identificación de los transformantes que contienen la integración de los casetes de integración en el locus definido; y
- (d) un método de producción de la proteína heteróloga.

En consecuencia, un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento de integración localizada de por lo menos tres copias de un gen de interés en el genoma de una cepa de *Yarrowia* que comprende las etapas de:

- a) puesta en cultivo de una cepa de *Yarrowia* que comprende por lo menos tres deleciones seleccionadas de entre Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones a una auxotrofia para dicha cepa, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes;
- b) transformación de dicha cepa de *Yarrowia* auxótrofa con por lo menos tres vectores recombinantes que comprenden unos marcadores de selección que permiten, para dicha cepa de *Yarrowia* la complementación de la auxotrofia resultante de cada una de dichas deleciones, comprendiendo dichos vectores recombinantes

cada uno:

i) la secuencia de dicho gen de interés,

5 ii) un marcador de selección, y

10 iii) dos secuencias de ADN que enmarcan la secuencia de dicho gen de interés y dicho marcador de selección, siendo dichas secuencias de ADN homólogas a las secuencias que corresponden a los extremos del sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* de manera que permitan la integración localizada de dicho vector recombinante por recombinación homóloga;

selección sobre un medio mínimo, de las levaduras que han integrado dichos por lo menos tres vectores recombinantes.

15 Se describe también un procedimiento de integración localizada y se caracteriza por que los genes que presentan una delección asociada a un fenotipo de auxotrofia o de carácter dominante se seleccionan:

- para los marcadores de auxotrofia, de entre los genes URA2, LEU2, GUT2, ADE2, HIS y LYS5; y

20 - para los caracteres dominantes, de entre el gen de resistencia a la higromicina HYG4, y los genes MDR3, KanMX, HPH y Tn5ble.

25 En un modo de realización preferido, dicha cepa comprende además por lo menos una delección de un gen asociado a un carácter dominante seleccionado de entre el gen de resistencia a la higromicina HPH (HYG), y los genes MDR3, KanMX, y Tn5ble, siendo el más preferido el gen HYG.

En un modo de realización preferido, la etapa b), el sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* se selecciona de entre los genes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 y XPR2.

30 Ventajosamente, la delección URA3 corresponde a la delección Ura3-302 bien conocida por el experto en la materia y descrita en particular en MADZAK *et al.* (2004).

35 Ventajosamente, la delección LEU2 corresponde a la delección Leu2-270 también bien conocida por el experto en la materia y descrita en particular en MADZAK *et al.* (2004).

40 Ventajosamente, la delección GUT2 corresponde a la delección Gut2-744 descrita en los ejemplos. Gut2-744 corresponde a una delección completa de ORF del gen GUT2 (SEC ID nº 4), estando dicha delección presente en las cepas mutantes FF-Lug (CNCM-3911) y FF-luga (CNCM-3913). Después de la escisión, en el genoma de *Yarrowia*, entre las secuencias promotoras y terminadoras de GUT2, permanece la secuencia SEC ID nº 11.

45 Ventajosamente, la delección ADE2 corresponde a la delección Ade2-844 descrita en los ejemplos. Ade2-844 corresponde a una delección completa de ORF del gen ADE2 (SEC ID nº 3), estando dicha delección presente en las cepas FF-Lua (CNCM-3912) y FF-luga (CNCM-3913). Después de la escisión, en el genoma de *Yarrowia*, entre las secuencias promotoras y terminadoras de ADE2, permanece la secuencia SEC ID nº 12.

Por medio mínimo, se entiende en la presente memoria un medio que no comprende los elementos para los cuales la cepa de *Yarrowia* es auxótrofa, o que permite, llegado el caso, la selección de la cepa.

50 Unas cepas de *Yarrowia* son bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplo preferido de dichas cepas, se pueden citar las cepas de *Yarrowia lipolytica*.

55 La técnica de transformación de una levadura por integración localizada de un gen es una técnica de biología molecular utilizada frecuentemente. En esta técnica, un fragmento de ADN se clona en un vector, se introduce en la célula a transformar, integrándose entonces dicho fragmento de ADN por recombinación homóloga en una región específica del genoma receptor (ORR-WEAVER *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 78, p. 6354-6358, 1981). Dichos procedimientos de transformación son bien conocidos por el experto en la materia y están descritos en particular en ITO *et al.* (J. Bacteriol., vol. 153, p. 163-168, 1983) en KLEBE *et al.* (Gene, vol. 25, p. 333-341, 1983) y en GYSLER *et al.* (Biotechn. Techn., vol. 4, p. 285-290, 1990). En la medida en la que este evento de recombinación es raro, se insertan unos marcadores de selección entre las secuencias que aseguran la recombinación con el fin de permitir, después de la transformación, aislar las células en las que se ha producido la integración del fragmento mediante la puesta en evidencia de los marcadores correspondientes.

60 Los marcadores de selección que permiten la complementación de una auxotrofia, también denominados comúnmente marcadores de auxotrofia, son bien conocidos por el experto en la materia.

65 El marcador de selección URA3 es bien conocido por el experto en la materia. Más específicamente, una cepa de

*Yarrowia* cuyo gen URA3 (SEC ID nº 1 para *Yarrowia lipolytica*, dicha secuencia es también accesible por el número de acceso Yali0E26719g en la dirección «<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#>»), que codifica para la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con uracilo. La integración del marcador de selección URA3 en esta cepa de *Yarrowia* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa sobre un medio desprovisto de uracilo.

El marcador de selección LEU2 descrito en particular en la patente US nº 4.937.189 es también bien conocido por el experto en la materia. Más específicamente, una cepa de *Yarrowia* cuyo gen LEU2 (Yali0E26719g; SEC ID nº 2 para *Yarrowia lipolytica*), que codifica para la  $\beta$ -isopropilmalato deshidrogenasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con leucina. Como anteriormente, la integración del marcador de selección LEU2 en esta cepa de *Yarrowia* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa en un medio no suplementado con leucina.

El marcador de selección ADE2 es también bien conocido por el experto en la materia en el campo de la transformación de la levadura. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen ADE2 (SEC ID nº 3 para *Yarrowia lipolytica*, YALI0B23188g), que codifica para la fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con adenina. De nuevo, la integración del marcador de selección ADE2 en esta cepa de *Yarrowia* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa en un medio no suplementado con adenina.

El gen GUT2 codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (SEC ID nº 4, para *Yarrowia lipolytica*, YALI0B13970g) y su inactivación (por ejemplo por delección) conlleva la incapacidad para el mutante resultante de crecer en un medio no fermentable cuya fuente de carbono corresponde a glicerol.

Entre los genes de resistencia que podrán ser utilizados como marcadores de selección para conferir a la cepa *Yarrowia* un fenotipo que presenta un carácter dominante, se pueden citar:

- El gen MDR3 originario del ratón que codifica para la P-glicoproteína y, cuando está expresado en una cepa de *Yarrowia*, confiere una resistencia al FK520 (agente antifúngico e inmunosupresor; RAYMOND *et al.*, Mol. Cell. Biol., vol. 14, p. 277-286, 1994).
- El módulo KanMX, que contiene la secuencia kan<sup>r</sup> procedente del transposón Tn903 de *Escherichia coli* fusionada a las secuencias transcripcionales del gen TEF del hongo filamentoso *Ashbya gossypii*, o a cualquier promotor o terminador de transcripción funcionales, confiere a una cepa de *Yarrowia* la resistencia a la geneticina (G418; WACH *et al.*, Yeast, vol. 10, p. 1793-1808, 1994).
- El gen HPH (HYG), originario de un plásmido de *Escherichia coli*, permite la resistencia a la higromicina B (GRITZ & DAVIES, Yeast, vol. 8, p. 667-668, 1992; CORDERO OTERO & GAILLARDIN, Applied Microbiol and Biotechnology, vol. 46, p. 143-148, 2004).
- El gen Tn5ble, procedente de *Escherichia coli*, permite que la levadura transformada adquiera una resistencia a la fleomicina (WENZEL *et al.*, Yeast, vol. 8, p. 667-668, 1992).

Otros marcadores que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención están también descritos por BARTH & GAILLARDIN (The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. En: Non conventional yeasts in biotechnology (Wolf K. Ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 313-388, 1996).

En un modo de realización también preferido, el procedimiento de integración localizada según la invención se caracteriza por que en la etapa b), el sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* se selecciona de entre los genes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 y XPR2.

Preferentemente, el procedimiento de integración localizada se caracteriza por que en la etapa b), el sitio de integración en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* se selecciona de entre los genes cuya ruptura confiere un fenotipo fácilmente detectable (visualizable, medible), en particular de entre los genes URA3, ADE2, LIP2, LIP8, AXP.

Así, según un modo de realización preferido, en la etapa b), el sitio de integración localizada en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* se selecciona de entre los genes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP8 y AXP.

El gen LIP2 (SEC ID nº 5 para *Yarrowia lipolytica*) se puede utilizar como locus de inserción. El gen LIP2 que codifica para una lipasa extracelular (PIGNEDE *et al.*, J. Bacteriol., vol. 182(10), p. 2802-10, 2000) que hidroliza preferentemente los triglicéridos de cadena larga de los restos oleicos. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen LIP2 está inactivado (por ejemplo por delección), presentará una actividad lipasa reducida (baja actividad lipasa extracelular, bajo halo de hidrólisis sobre placa de Petri de la tributirina).

El gen LIP8 (SEC ID nº 6 para *Yarrowia lipolytica*) se puede utilizar como locus de inserción. El gen LIP8 codifica

para una triacilglicerol hidrolasa. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen LIP8 está inactivado (después de inactivar LIP2) no presentará ningún halo de hidrólisis de la tributirina sobre placa YNBT y ninguna actividad lipasa (FICKERS *et al.*, Fungal Genetics and Biology, vol. 42, p. 264-274, 2005).

5 El gen AXP (SEC ID nº 7 para *Yarrowia lipolytica*) se puede utilizar como locus de inserción. El gen AXP codifica para una proteasa ácida extracelular normalmente expresada cuando el pH del medio es inferior 4. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen AXP está inactivado (por ejemplo por delección), presentará sobre placa YNBcaseína a pH ácido un halo de hidrólisis de la caseína disminuido y una actividad proteasa disminuida (GLOVER *et al.*, Microbiology, vol. 143, p. 3045-54, 1997).

10 El gen XPR2 codifica para una proteasa alcalina extracelular expresada cuando el pH del medio es superior a 6. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen XPR2 (SEC ID nº 8 para *Yarrowia lipolytica*) está inactivado (por ejemplo por delección), presentará en placa YNBcaseína a pH6 un halo de hidrólisis de la caseína disminuido y una actividad proteasa disminuida (DAVIDOW *et al.*, J. Bacteriol., vol. 169, p. 4621-9, 1987).

15 A título de ejemplo, se puede citar la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo el número CNCM-3912.

20 A título de ejemplo, se puede citar la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo el número CNCM-3911.

25 Ventajosamente, dicha cepa de *Yarrowia* comprende cuatro genes que presentan independientemente entre sí una delección asociada a un fenotipo de auxotrofia o de carácter dominante, preferentemente seleccionados de entre los genes URA3, LEU2, GUT2 y ADE2.

30 La presente solicitud se refiere asimismo a la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo el número CNCM-3913.

35 Según un modo de realización preferido del procedimiento según la invención, éste permite la integración localizada de 3 a 10 copias del gen de interés, preferentemente de 4 a 8 copias y, de manera particularmente preferida, de 5 a 7 copias de dicho gen de interés.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención comprende la transformación de dicha cepa de *Yarrowia* auxótrofa con tres a diez vectores recombinantes, preferentemente de 4 a 8 vectores recombinantes y, de manera particularmente preferida, de 5 a 7 vectores recombinantes.

40 Los vectores recombinantes utilizados en la etapa b) podrán comprender además uno o varios marcadores de selección distintos de los que permiten, para dicha cepa de *Yarrowia*, la complementación de la auxotrofia y, llegado el caso, del carácter dominante resultante de las delecciones entre por lo menos los tres genes.

45 Las secuencias que codifican para el marcador de selección y las del gen de interés comprenden además los elementos necesarios para su expresión en una cepa de *Yarrowia*.

Dichos elementos corresponden en particular a unas secuencias promotoras y terminadoras activas en una cepa de *Yarrowia*. Preferentemente las secuencias promotoras y terminadoras utilizadas pertenecen a unos genes diferentes con el fin de minimizar los riesgos de recombinación no deseada en el genoma de la cepa de *Yarrowia*.

50 Dichas secuencias promotoras son bien conocidas por el experto en la materia y pueden corresponder en particular a unos promotores inducibles o constitutivos. A título de ejemplo de promotores que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención, se puede citar en particular el promotor de un gen de *Yarrowia lipolytica* que está reprimido en gran medida por la glucosa y que es inducible por los ácidos grasos o los triglicéridos tal como el promotor POX2 del gen de acil CoA oxidasa 2 de *Yarrowia lipolytica* y el promotor del gen LIP2 descrito en la solicitud PCT WO 01/83773. Se puede utilizar también el promotor del gen FBA1 del gen de la fructosa-bisfosfato aldolasa (US 2005/0130280), el promotor del gen YAT1 del gen transportador del amonio (US 2006/0094102 A1), el promotor del gen GPAT del gen de la glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (US 2006/0057690 A1), el promotor del gen TEF (US 2001/6265185) y el promotor híbrido hp4d (WO 9641889).

60 Dichas secuencias terminadoras son también bien conocidas por el experto en la materia y se pueden citar a título de ejemplo de secuencias terminadoras que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención la secuencia terminadora del gen PGK1, la secuencia terminadora del gen LIP2 descrito en la solicitud PCT WO 01/83773.

65 Cuando el producto del gen de interés está destinado a ser segregado por la célula huésped, dicho inserto comprende además unas señales de control de la secreción de dicho producto. Se puede utilizar con este fin unas

secuencias señal funcionales en las cepas de *Yarrowia*, por ejemplo la totalidad o parte de la secuencia prepro del gen LIP2 descrito en la solicitud PCT WO 01/83773.

5 El gen de interés codifica para un polipéptido que se desea producir en gran cantidad en la cepa de *Yarrowia* transformada. Dicho polipéptido corresponde preferentemente a un polipéptido heterólogo, como por ejemplo la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (SEC ID nº 9) o de *Escherichia coli* (SEC ID nº 10), pero puede también corresponder a un polipéptido autólogo como la lipasa LIP2 de *Yarrowia lipolytica* descrita anteriormente.

10 Según un modo de realización particular del procedimiento según la invención, las etapas b) de transformación de la cepa de *Yarrowia* y c) de selección sobre medio mínimo, se efectúan separadamente para cada uno de dichos por lo menos tres vectores recombinantes.

15 Según un modo de realización más preferido, el procedimiento de integración localizada según la invención se caracteriza por que en la etapa b), las transformaciones con por lo menos los tres vectores recombinantes se realizan de manera independiente y sucesivamente con cada uno de los vectores recombinantes, o simultáneamente con el conjunto de dichos vectores recombinantes, y por que el conjunto de estas transformaciones está seguido de una etapa c) de selección sobre un medio mínimo de las levaduras que han integrado el conjunto de dichos vectores recombinantes.

20 Según un modo de realización también preferido, el procedimiento según la invención se caracteriza por que el marcador de selección está enmarcado por unas secuencias que permiten su escisión después de la integración localizada de dicho vector recombinante.

25 Se describe también un procedimiento según la invención, en el que el marcador de selección está enmarcado por unas secuencias que permiten su escisión después de la integración localizada de dicho vector recombinante.

El procedimiento según la invención permite entonces reutilizar un mismo marcador de selección, en particular un marcador de auxotrofia, para otra integración localizada durante una nueva etapa de transformación.

30 Dichas secuencias que permiten la escisión y la eliminación, en una cepa de *Yarrowia*, de una secuencia enmarcada son bien conocidas por el experto en la materia.

35 A título de ejemplo, se puede citar la utilización de dos secuencias idénticas o similares, denominadas secuencias repetidas directas (SRD), con el fin de obtener un evento de recombinación como se describe en la patente EP 0 994 192 B1 o en la patente EP 0 635 574 B1.

40 A título de ejemplo, se puede citar el sistema «Cre-lox» tal como se describe en la patente EP 0 220 009 B1, en el que las secuencias equivalentes a las secuencias repetidas directas son, en este caso, unas secuencias específicas denominadas «lox» y la escisión de la secuencia de ADN comprendida entre las dos secuencias «lox» se efectúa en presencia de una recombinasa «Cre» expresada por un vector de expresión. Otros sistemas equivalentes y que utilizan otras recombinasas específicas son también conocidos por el experto en la materia, en particular el procedimiento descrito en la patente EP 0 814 165 B1.

45 Según otro aspecto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de un polipéptido codificado por un gen de interés, caracterizado por que comprende:

- A) un procedimiento de integración localizada según la invención;
- 50 B) una etapa d) de cultivo de la cepa de *Yarrowia* modificada obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un medio de cultivo líquido que comprende unas fuentes asimilables de carbono, de nitrógeno y de sales inorgánicas con el fin de permitir el crecimiento de dicha cepa transformada de *Yarrowia*, y
- 55 C) la recuperación de dicho polipéptido de interés expresado a partir de las células *Yarrowia* o del medio de cultivo obtenido en la etapa B).

Ventajosamente, el procedimiento según la invención comprende una etapa e), después de la etapa C), de purificación de dicho polipéptido codificado por el gen de interés.

60 Esta etapa e) de purificación se puede efectuar o bien después de la lisis celular o bien, ventajosamente, a partir del medio de cultivo en el que está segregado por las células, mediante técnicas clásicas, conocidas en sí mismas, por ejemplo por precipitación fraccionada seguida de una o varias etapas de cromatografía.

65 Las células de *Yarrowia* transformadas susceptibles de ser obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la invención también forman parte de la presente invención.



Así, la presente invención se refiere también a una cepa de *Yarrowia* auxótrofa susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según la invención, comprendiendo dicha cepa por lo menos tres deleciones seleccionadas de entre Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones a una auxotrofia dominante para dicha cepa, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una cepa modificada de *Yarrowia* con por lo menos tres vectores que permiten llegar a una cepa de *Yarrowia* que comprende por lo menos tres deleciones seleccionadas de entre Ura 3-302, Leu 2-270, Gut 2-744 y Ade 2-844, y caracterizada por que, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes, el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones corresponde a una auxotrofia o a un carácter dominante para dicha cepa.

Preferentemente en este caso, la cepa comprende además por lo menos un gen asociado a un fenotipo de carácter dominante seleccionado de entre: el gen de resistencia a la higromicina HPH (HYG), y los genes MDR3, KanMX y Tn5ble, siendo el gen HYG también el más preferido de los genes de resistencia.

Se describe asimismo una cepa de *Yarrowia* auxótrofa y, llegado el caso, que presenta un carácter dominante adquirido, susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento de obtención de una cepa modificada de *Yarrowia* según la invención, comprendiendo dicha cepa una deleción en por lo menos tres genes de su genoma y caracterizada por que, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes, el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones corresponde a una auxotrofia o a un carácter dominante para dicha cepa. Cada una de las preferencias definidas para el número de genes delecionados, los genes seleccionados para la deleción tales como las definidas para la etapa a) del procedimiento de integración según la presente invención, también se prefieren para este procedimiento.

Ventajosamente, dicha cepa de *Yarrowia* obtenida por este procedimiento es una cepa de *Yarrowia lipolytica*.

Preferentemente, dicha cepa de *Yarrowia* auxótrofa comprenderá por lo menos una mutación entre los genes URA3, LEU2 y ADE2 o URA3, LEU2 y GUT2.

A título de ejemplo, se pueden citar las cepas de *Yarrowia lipolytica* depositadas el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo los números CNCM I-3911 y CNCM I-3912.

Según un segundo modo de realización preferido, la cepa de *Yarrowia* auxótrofa utilizada en el procedimiento según la invención comprende una mutación entre cuatro genes necesarios para el crecimiento de dicha cepa, estando estos tres genes seleccionados de entre grupo que comprende URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 y XPR2.

Preferentemente, dicha cepa de *Yarrowia* auxótrofa comprenderá por lo menos una mutación entre los genes URA3, LEU2, ADE2 y GUT2.

A título de ejemplo se puede citar la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo el número CNCM I-3913.

La presente invención se entenderá mejor con la ayuda de las figuras y de sus leyendas y del complemento de descripción dado a continuación, que se refiere a ejemplos no limitativos de obtención de cepas transformadas de *Yarrowia lipolytica* de acuerdo con la invención.

#### Leyendas de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de la construcción de "casete de integración" localizada de "casete de expresión". 1) El gen de interés está clonado en un vector de expresión, 2) el casete de expresión está liberado por una digestión I-SceI, 3) y después está clonado en diferentes vectores de integración, 4) los casetes de integración son liberados por una digestión NotI, purificados y utilizados para transformar una cepa de integración.

Figura 2: Representación esquemática del vector de clonación. 1) el vector de clonación comprende un promotor fuerte seguido de sitios de restricción única para la clonación del gen de interés, de un terminador de transcripción, y a uno y otro lado de un sitio raro para permitir la escisión del casete de expresión, 2) el vector pVC de base contiene un multi-sitio compuestos de sitios ClaI, BamHI, KpnI y AvrII, la secuencia terminadora del gen LIP2 (LIP2term) con, a uno y otro lado, el sitio raro I-CeuI, 3) el vector de expresión contiene el promotor pPOX2 clonado en los sitios ClaI y BamHI, 4) el casete de expresión se obtiene por clonación de múltiples sitios del gen de interés, por ejemplo BamHI-AvrII, y después una digestión del vector de expresión por I-CeuI.

Figura 3: Representación esquemática del vector de integración y obtención del casete de integración localizada. 1) el vector de integración contiene una región aguas arriba del locus de inserción (región P, por promotora) y una región aguas abajo del locus de inserción (región T, por terminadora) con, a uno y otro lado, un sitio raro 1 para la escisión del casete de integración. Entre las regiones P y T están presentes dos sitios raros, el sitio raro 2 para la inserción del marcador de selección, y el sitio raro 3 para la inserción del casete de expresión.

Figura 4: Representación esquemática de los vectores de integración para una integración aleatoria. I) representación esquemática del vector que comprende un sitio raro 1 que se puede utilizar para liberar el casete de expresión de la parte plásmido, un sitio raro 2 para la clonación del marcador de selección para *Y. lipolytica*. Contiene un promotor entre los sitios ClaI y BamHI (en este caso el promotor pPOX2), el terminador del gen LIP2 y las regiones Zeta para una integración aleatoria (véase la patente de amplificación). La serie JMP61 presenta la secuencia de direccionamiento de la lipasa Lip2. II) Representación esquemática de los vectores de integración para una integración aleatoria construida con el sitio NotI como sitio raro 1 y el sitio I-SceI como sitio raro 2 utilizado para la inserción de los marcadores URA3. LEU2. Hyg, GUT2 y ADE2.

Figura 5: expresión de la asparaginasa en las cepas que contienen diferente número de copias del gen. A) análisis sobre gel de electroforesis NuPAGE al 10% y coloración con azul coloidal (equivalente a 30 µl de sobrenadante), B) análisis sobre gel de electroforesis NuPAGE al 10%, transferencia y detección por transferencia Western con un anticuerpo anti-asparaginasa (equivalente a 10 µl de sobrenadante). La banda a corresponde a la proteína no glicosilada y la banda b corresponde a la proteína mono-glicosilada. L1, cepa receptora FF-luga; L2, cepa 5LAsp1 : ade2 :: GUT2-Asp, 1 copia; L3, cepa 6LAsp1 : ade2 :: GUT2-Asp, 1 copia; L4, cepa 15LAsp2 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp, 2 copias; L5, cepa 21LAsp2 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp, : 2 copias; L6, cepa 1LAsp3 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp leu2 :: ADE2-Asp : 3 copias; L7, cepa 2LAsp4 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp leu2 :: ADE2-Asp ura3 :: LEU2-Asp : 4 copias.

Figura 6: Análisis fenotípico Suc+/Suc- para verificar la inserción en el locus URA3. Los transformantes obtenidos con el casete de integración localizada en el locus URA3 se ensayan por estría sobre placas de medio rico en glucosa (YPD) y sacarosa (YPS). Las cepas receptoras Suc+ FF-lug, FF-lua y FF-luga se utilizan como control.

Figura 7: Análisis fenotípico Lip+/Lip- para verificar la inserción en el locus LIP2. Los transformantes obtenidos con el casete de integración localizada en el locus LIP2 se cultivan en medio rico en ácido oleico (YPD2O2). La actividad lipasa en el sobrenadante de las cepas contiene diferentes copias de la asparaginasa. La cepa receptora Lip+ FF-luga se utiliza como control. Cepas con 1 copia en el locus ADE2 (ade2 :: GUT2-Asp) : 5LAsp1 y 6LAsp1; cepas con 1 copia en el locus ADE2 y 1 copia en el locus LIP2 (ade2 :: GUT2-Asp, lip2 :: URA3-Asp) : 14LAsp2, 15LAsp2, 16LAsp2, 17LAsp2 y 21 LAsp2.

Figura 8: Determinación del número de copias de los genes LIP2 y Asp por RT-qPCR en los transformantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Cepas utilizadas en los ejemplos

Las cepas utilizadas en el procedimiento de la invención se derivan de una cepa salvaje de *Yarrowia lipolytica*, en particular de la cepa salvaje *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC 20460, clasificada bajo CLIB89 en la colección del CIRM (Centre International de Ressources Microbiennes).

Así, se pueden utilizar nuevas cepas mutantes que se derivan de la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460 por medio de la cepa Po1d [cepa auxótrofa para la leucina (Leu-) y el uracilo (Ura-)], descrita en la revista de G. Barth *et al.*: *Yarrowia lipolytica*. En: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook* (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag. Está clasificada bajo CLIB139 en la CIRM.

La obtención de estas nuevas cepas receptoras (FF-lu, FF-lug (CNCM I-3911), FF-lua (CNCM I-3912), FF-luga (CNCM I-3913)) se describirá más adelante.

### Obtención de las cepas

La obtención de las cepas mutantes receptoras que se pueden utilizar en el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo a partir de la cepa Po1d, que se deriva de la cepa salvaje *Yarrowia lipolytica* W29. La cepa Po1d es una cepa auxótrofa para la leucina (leu-) y el uracilo (ura-). Está descrita en la revista de G. Barth *et al.*: *Yarrowia lipolytica*. En: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook* (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York. Está clasificada bajo CLIB139 en la colección del CIRM. La obtención de las cepas mutantes que se pueden utilizar en el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo mediante la inserción de delección de gen que confiere una auxotrofia o que confiere un defecto de crecimiento sobre ciertos medios, cuyo gen presenta una delección, si es posible una delección que no se pueda revertir, ventajosamente que corresponda a una delección completa del gen, cuyo gen correspondiente pueda ser utilizado como marcador de selección para la selección de los transformantes que han integrado los casetes de integración. Las delecciones

presentarán una delección importante con respecto al casete correspondiente utilizado para la construcción de los marcadores de selección, con el fin de disminuir la tasa de conversión.

1. Delección del gen GUT2 ( $\Delta$ gut2-744), construcción del marcador GUT2 y obtención de la cepa mutante FF-lug (CNCM I-3911).

1.1 Delección del gen GUT2 ( $\Delta$ gut2-744)

Para obtener esta cepa, se puede proceder de la siguiente manera:

- 1) se selecciona el gen de interés que se quiere eliminar;
- 2) se construye un casete de interrupción por clonación o por PCR ("Polymerase Chain Reaction") amplificando la región aguas arriba del gen (región "promotora" simbolizada por P) y la región aguas abajo del gen (región "terminadora", simbolizada por T);
- 3) se introduce un marcador de selección que contiene a uno y otro lado una secuencia de recombinación (ventajosamente una secuencia loxP o loxR o derivada) que permite una recombinación entre sí para la eliminación del marcador (ventajosamente una secuencia de tipo loxP que permite la recombinación bajo la acción de la recombinasa cre);
- 4) se transforma con el casete de interrupción y se seleccionan las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes) y se verifica la interrupción del gen;
- 5) se transforma con un vector que permite la expresión de la recombinasa (ventajosamente la recombinasa cre que permite la recombinación de las secuencias loxP/loxR y la eliminación del marcador);
- 6) se aísla un clon que presenta la delección del gen de interés y que ha perdido el plásmido de expresión de la recombinasa.

A partir del mutante FF-lu auxótrofo (Leu-, Ura-), se ha construido una cepa *Y lipolytica* mutante FF-lug auxótrofa para la leucina y el uracilo (Leu-, Ura-) e incapaz de utilizar el glicerol como fuente de carbono (gly-). La primera etapa es la construcción de la cepa FF-lug :: URA3 protótrofa para el uracilo (Leu-, Ura+) por delección del gen GUT2 por el casete de interrupción gut2 :: URA3ex transformando el fragmento de PCR GUT2-PUexT (JME744) y seleccionando los Ura+ sobre YNBcasa. Se seleccionan los auxótrofos para el uracilo (Leu+, Ura-) por escisión del marcador URA3ex transformando con el vector replicativo pRRQ2 que contiene la recombinasa Cre y el marcador LEU2 (Cre-LEU2) y seleccionando los transformantes auxótrofos para el uracilo, Leu+. La pérdida del plásmido pRRQ2 se realiza mediante un cultivo sobre medio rico en YPD y por aislamiento de un clon (Leu-, Ura-, Gly-).

La representación esquemática de la construcción de estos mutantes se resume en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Etapas de transformación requeridas para la producción del mutante FF-lug

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	FF-lu, PO1d, Leu-, Ura-	Gut2-PUexT	JMY1202, Leu-, Ura+, Glygut2=PUexT
2	JMY1202, Leu-, Ura+, Gly-, gut2-PUexT	Vector pRRQ2 (pKS Cre ARS68 LEU2)	FF-lug JMY1346, Leu-, Ura-, Glygut2-744

El casete de interrupción para el gen GUT2 se ha construido por amplificación de la región aguas arriba (región P; YaliOB:1873518..1872400 complementaria, 1119 bp) y de la región aguas abajo (región T; YaliOB:1870468..1869652 complementaria, 817 bp), lo cual permite la delección de ORF del gen GUT2 (YaliOB1870469..1872401) y deja una homología con el marcador de selección GUT2ex-0.5 (485 bp con la región P y 56 bp en la región T) con el fin de minimizar las conversiones génicas. Los marcadores de selección ex se presentan en la tabla 11.

Las regiones P y T se amplificaron con los cebadores G3PD-P1, G3PD-P2, G3PD-T1 y G3PD-T2 (tabla 9).

Los cebadores G3PD-P2 y G3PD-T1 contienen el sitio raro I-SceI para la inserción del marcador de selección escindible URA3ex. El fragmento PT se ha clonado en pGEM-T (Invitrogen) para dar el plásmido pGEM-GUT2-PT (JME743). El plásmido de interrupción pGEM-GUT2-PUexT (JME744) se ha obtenido por inserción del marcador URA3ex e el sitio I-SceI que proviene del plásmido JME507.

El casete de interrupción (3245 pb) se ha obtenido por PCR con los cebadores G3PD-P1 y G3PD-T2. El producto de PCR se ha purificado sobre gel de agarosa con la ayuda del kit gel de extracción Qiagen. Las cepas se han transformado mediante el método con acetato de litio. Los transformantes Ura+ se han seleccionado sobre medio

YNBcasa.

Los transformantes Ura<sup>+</sup> se obtienen con una tasa de transformación típica (Fickers, 2003). La verificación de la interrupción del gen GUT2 se ha verificado mediante PCR con los cebadores en 5' de la región P (G3PDver1) y en 3' de la región T (G3PDver2). El mutante JMY1202 *gut2::URA3ex* ha sido transformado después por el plásmido replicativo pRRQ2 (pKS Cre ARS68 LEU2; JME461). Los transformantes obtenidos son cribados para la escisión del marcador URA3 y la pérdida del plásmido replicativo de expresión de la recombinada cre se realiza por un cultivo sobre medio rico YPD y por aislamiento de un clon (Leu-, Ura-, Gly-). Se ha seleccionado el mutante JMY1346 (FF-lug).

La secuencia del locus *gut2-844* del mutante JMY1346 se ha amplificado con los cebadores G3PDver1 y G3PDver2. Se ha secuenciado el producto de PCR de tamaño 2415 pb. La secuencia obtenida muestra la ausencia de marcador Ura3. Después de la escisión, permanecen sobre el genoma las secuencias siguientes entre P y T del locus GUT2: TGCAGCTTTTCGAGAACCGACGCCTGGGACCTGTGTCTGTAGGGATAACAGGGTAATTCGCTTCG GATAACTCCTGCTATAACGAAGTTATGTAGGGATAACAG GGTAAT (SEC ID nº 11; es decir el sitio I-SceI - secuencia LoxR - sitio I-SceI).

### 1.2 Construcción del marcador GUT2ex

Para la construcción del marcador GUT2ex, la secuencia genómica del locus GUT2 se ha amplificado con los cebadores G3PTS y G3PTR (tabla 8) y clonado en el vector pKS-LPR (Fickers *et al.*, 2003, Journal of Microbiological Methods, vol. 55, p. 727-737) en el sitio EcoRI. Contiene 492 pb de promotor, el ORF del gen GUT2, (ORF Yali0B:1870546..1872384) y 132 bp del terminador y que corresponde a la secuencia Yali0B:1872876..1870417. Este ORF contiene 2 sitios BamHI y 1 sitio EcoRI que se han eliminado por mutagénesis dirigida introduciendo unas mutaciones silenciosas. Se han utilizado los cebadores siguientes: G3PB1S y G3PB1R para el primer sitio BamHI (ggAtcc en ggCtcc), G3PB2S y G3PB2R para el segundo sitio BamHI (ggatcC en ggatcT) y G3PE1S y G3PE1R para el sitio EcoRI (gaAttc en gaGttc) (tabla 9).

El marcador puede ser insertado en los dos sentidos. Para este marcador GUT2ex0.5, se ha obtenido sólo el sentido 1 en el pKS-LPR. Después de la verificación por secuenciación, el plásmido que contiene el marcador GUT2ex0.5 modificado es JME792.

Otros dos marcadores GUT2ex1.0 y GUT2ex 1.5 que contienen 1 kb y 1,5 kb del promotor respectivamente se han construido como resultado de la dificultad para obtener unos transformantes a partir del marcador GUT2ex0.5 (párrafo 1.3). Estos promotores se han amplificado a partir del ADNg (cepa E150 *Yarrowia lipolytica*) con los cebadores P1KB y PNHE1 y P15KB y PNHE1, respectivamente. La clonación se ha realizado por ligadura de 3 vías entre el pKS-LPR (EcoRI desfosforilado), el producto de PCR (EcoRI y NheI) y el resto del marcador GUT2ex modificado procedente de JME792 (NheI y EcoRI). El marcador GUT2ex1.0 en el sentido 1 corresponde a JME919 y en el sentido 2 corresponde a JME920. El marcador GUT2ex1.5 en el sentido 1 corresponde a JME921 y en el sentido 2 corresponde a JME922.

### 1.3 Transformación con los marcadores GUT2ex0.5, GUT2ex1.0 y GUT2ex1.5.

Para validar la utilización del marcador GUT2ex, se ha aislado el marcador GUT2ex0.5 del plásmido JME792 (pKS-LPR-GUT2ex0.5) por digestión I-SceI y se ha insertado en el sitio I-SceI del plásmido JMP62 I-SceI (JME801) para dar lugar al plásmido JMP62Gut2-ex0.5 (JME805).

El plásmido JME805 ha sido digerido por NotI y se ha utilizado para transformar la cepa FF-lug mediante el método con acetato de litio. Los transformantes se han seleccionado sobre medio YNBcasa Glicerol al 1% suplementado con uracilo (100 mg/l). Después de varios intentos, este marcador no ha permitido obtener transformantes.

En una primera fase, se ha emitido la hipótesis de una defectibilidad muy importante de la parte promotora (492 pb). Por lo tanto, se han construido otros 2 marcadores que contienen unas partes promotoras más largas (véase el párrafo 1.2) es decir el marcador GUT2ex1.0 y GUT2ex1.5. Se han obtenido los mismos resultados.

Se ha descrito en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* una represión de la utilización de la glucosa en presencia de glicerol para unas cepas  $\Delta$ gut2. Efectivamente, la cepa FF-lug es incapaz de crecer en presencia de las 2 fuentes de carbono antes citadas. Modificando el presente método de transformación, se han obtenido unos transformantes. Este nuevo método de transformación sigue siendo idéntico al método con acetato de litio y con polietilenglicol (Gaillardin *et al.* 1985) al que se añade una etapa de fase de expresión antes de la extensión de la transformación sobre medios selectivos. Esta fase de expresión se realiza de la siguiente manera: después del choque térmico a 42°C durante 10 minutos, se centrifuga el producto de la transformación a 2000 rpm durante 3 min. y se lavan las células con 2 ml de tampón TE pH8. Este lavado se repite 2 veces. Las células son recogidas después con el medio nutritivo Yeast Extract al 1%, Peptonas al 1% y dextrosa al 0,2%. Se efectúa una incubación de 16 horas a 28 grados y sin agitación. De nuevo, se centrifuga a 2000 rpm durante 3 min. y se lavan las células con 2 ml de tampón TE pH 8. Este lavado se repite 2 veces. Las células son recogidas después con 2 ml de TE y se esparcen sobre

unos medios selectivos que contienen glicerol al 1% como única fuente de carbono.

Los resultados de la transformación del marcador GUT2ex1.0 en la cepa FF-lug se presentan en la tabla 2 siguiente:

5 Tabla 2: Eficacia de transformación según el método de transformación.

Tipo de integración	Método clásico sin fase de expresión		Nuevo método con fase de expresión	
	aleatoria	localizada	aleatoria	localizada
Número de transformantes	0	14	133	615
Tasa de transformación por µg de ADN	0	187	266	8215
% de integración	ND	75%	ND	100%

10 2. Deleción del gen ADE2 ( $\Delta$ ade2-844), construcción del marcador ADE2 y obtención de las cepas mutantes FF-lua (CNCM I-3912) y FF-luga (CNCM I-3913).

15 2.1 Deleción del gen ADE2 ( $\Delta$ ade2-844)

Para obtener estas cepas, se puede proceder de la siguiente manera: a partir del mutante FF-lu, se ha construido la cepa FF-lua Leu-, Ura-, Ade- y a partir del mutante FF-lug, se ha construido la cepa FF-luga Leu-, Ura-, Ade-, Gly-.

2.1.a. A partir del mutante FF-lu auxótrofo (Leu-, Ura-), se ha construido una cepa *Y. lipolytica* mutante FF-lua auxótrofa para la leucina, el uracilo y la adenina (Leu-, Ura-, Ade-). La primera etapa es la construcción de la cepa FF-lua :: URA3 protótrofa para el uracilo (Leu-, Ura+, Ade-) por deleción del gen ADE2 por el casete de interrupción Ade2 :: URA3ex transformando el casete NotI PTade2-Ura3Ex (JME844) y seleccionando las Ura+ sobre YNBcasa, suplementado con adenina (800 mg/l). Se seleccionan los auxótrofos para el uracilo (Leu+, Ura-, ade-) por escisión del marcador URA3ex transformando con el vector replicativo pRRQ2 que contiene la recombinasa Cre y el marcador LEU2 (Cre-LEU2) y seleccionando los transformantes auxótrofos para el uracilo, Leu+. La pérdida del plásmido replicativo pRRQ2 de expresión de la recombinasa cre se realiza mediante un cultivo sobre medio rico YPD y por aislamiento de un clon (Leu-, Ura-, Ade-). Se ha seleccionado el mutante JMY1409 (FF-lua).

2.1.b. A partir del mutante FF-lug auxótrofo (Leu-, Ura-) e incapaz de utilizar el glicerol como fuente de carbono (Gly-), se ha construido una cepa *Y. lipolytica* mutante FF-luga auxótrofa para la leucina, el uracilo y la adenina (Leu-, Ura-, Ade-) e incapaz de utilizar el glicerol como fuente de carbono (Gly-). La primera etapa es la construcción de la cepa FF-luga :: URA3 auxótrofa para la leucina y la adenina (Leu-, Ade-, Ura+) por deleción del gen ADE2 por el casete de interrupción ade2 :: URA3ex transformando el casete NotI PTade2-PUra3ExT (JME844) y seleccionando los Ura+ sobre YNBcasa suplementado con adenina (800 mg/l). Se seleccionan los auxótrofos para el uracilo (Leu+, Ura-) por escisión del marcador URA3ex transformando con el vector replicativo pRRQ2 que contiene la recombinasa Cre el de marcador LEU2 (Cre-LEU2) y seleccionando los transformantes auxótrofos para el uracilo, Leu+. La pérdida del plásmido pRRQ2 se ha realizado mediante un cultivo sobre medio rico YPD y mediante el aislamiento de un clon (Leu-, Ura-, Ade-, Gly-). Se ha seleccionado el mutante JMY1404 (FF-luga).

La representación esquemática de la construcción de estos mutantes se resume en la tabla 3 siguiente.

40 Tabla 3: Etapas de transformación requeridas para la producción de los mutantes FF-lua y FF-luga

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	PO1d, Leu-, Ura-	PTade2-Ura3Ex	JMY1407, Leu-, Ura+ ade2-PUexT
2	JMY1407, Leu-, Ura+ ade2-PUexT	Vector pRRQ2, selección Leu+, verificación Gly-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD, aislamiento de Leu-	JMY1409, Leu-, Ura-, Aide-ade2-844 FF-lua
1b	JMY1346, Leu-, Ura-, Gly-gut2-744	PTade2-Ura3Ex	JMY1396, Leu-, Ura+ Gly- ade2-PUexT
2b	JMY1396, Leu-, Ura+, Gly-ade2-844	Vector pRRQ2, selección Leu+, verificación Gly-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD, aislamiento de Leu-	JMY1404, Leu-, Ura-, Ade-, Gly-, ade2-844 FF-luga

45 El casete de interrupción para el gen ADE2 (Yali0B23188g; highly similar to trjQ9P4V1 *Candida boidinii*), codifica para la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa, proteína deducida de 565 aa (Yali0B:3030460..3032157, sentido) se ha construido por amplificación de la región aguas arriba (región P; Yali0B:3029011..3029931, 920 bp) y de la región aguas abajo (región T; 792 pb, Yali0B:3031871..3032662) lo cual permite la deleción del ORF del gen ADE2

Yali0B:3030460..3032157). La región eliminada es de 1939 pb (Yali0B:3029932..3031870) y que deja sólo una homología muy baja con el marcador de selección ADE2ex (0 bp con la región P y 415 bp en la región T) con el fin de minimizar las conversiones génicas. El marcador ADE2ex corresponde a la región Yali0B:3029961..3032280 fragmento de 2319 pb. Los marcadores de selección ex se presentan en la tabla 11.

Las regiones P y T se han amplificado con los cebadores siguientes P1ADE2, P2ADE2, T1ADE2, T2ADE2 (Tabla 9).

Los cebadores P2 y T1 contienen el sitio raro I-SceI para la inserción del marcador de selección escindible URA3ex. El cebador T1 contiene también el sitio raro I-CeuI para la inserción del casete de expresión. Los cebadores P1 y T2 contienen el sitio raro NotI para la clonación en pHSS6-NotI (JME800). El fragmento PT se ha clonado en el JME800 digerido por NotI y se ha desfosforilado para dar el plásmido pADE2-PT en la orientación 1 (sentido 1, JME813) o en la orientación 2 (sentido 2, JME814). El sentido se define según la orientación del sitio I-SceI: o bien el sentido 1 con el sitio I-SceI como sentido, o bien el sentido 2 con el sitio I-SceI como complementario. El plásmido de interrupción pPTAde2-Ura3Ex (JME844) ha sido obtenido por inserción del marcador URA3ex en el sitio I-SceI del plásmido JME813.

El casete de interrupción se ha obtenido por digestión NotI y purificación de la banda de 3089 pb. La cepa Pold se ha transformado mediante el método con acetato de litio. Los transformantes Ura+ se han seleccionado sobre medio YNBcasa suplementado con adenina (100 mg/l). Las concentraciones típicas necesarias para la complementación de una auxotrofia que se utilizan están generalmente comprendidas entre 100 a 200 mg/l. Los transformantes Ura+ se obtienen con una tasa de transformación baja, del orden de 50 transformantes por microgramo de ADN, el análisis de los transformantes ha revelado que contenían una conversión del marcador ura3-302 y no la delección del gen ADE2.

Se han realizado varios ensayos de interrupción con unas concentraciones crecientes de adenina. Para obtener unas tasas de transformación superiores a 103 transformantes por µg de ADN, es necesario tener una concentración superior a 400 mg/l de adenina en los medios. La concentración utilizada para la complementación es de 800 mg/l. Es sólo con estas condiciones con las que se han obtenido unos transformantes que presentan una interrupción del gen ADE2. Al contrario que *S. cerevisiae*, las cepas Ade- no presentan color rosa. Por el contrario, los clones Ade- de *Y. lipolytica* presentan un color marrón después de varios días sobre la placa y un sobrenadante marrón en medio líquido: fenotipo que se puede utilizar para identificar que los transformantes o la integración del casete de expresión están bien integrados en el locus ADE2.

Verificación de la secuencia del locus ade2-844. La secuencia del locus ade2-844 se ha amplificado con los cebadores ver1ade2 y ver2ade2 (tabla 9). Se ha secuenciado el producto de PCR de tamaño 2204 pb. La secuencia obtenida muestra la ausencia de la secuencia de marcador URA3. Además, esta verificación muestra la ausencia de la integración de los sitios NotI en 5' y 3' del casete de interrupción PUexT. Después de la escisión, sobre el genoma permanecen las secuencias siguientes entre P y T del locus ade2: TAGGGATAACAGGGTAATTATCGCTTCGGATAACTCCTGCTATAGGAAGTTATGTAGGGATAACAGGGTAATTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGA (SEC ID nº 12) es decir los sitios siguientes I-SceI - LoxR - I-SceI - I-CeuI.

## 2.2 Construcción del marcador ADE2ex

Para la construcción del marcador ADE2ex, se ha amplificado la secuencia genómica del locus ADE2 utilizando los cebadores ADE2S y ADE2R y se ha clonado en el vector pKS-LPR (Fickers *et al.*, 2003, Journal of Microbiological Methods, vol. 55, p. 727-737) en el sitio EcoRI. Contiene 500 bp de promotor, el ORF del gen ADE2 (Yali0B23188g) y 125 bp del terminador, y que corresponde a la secuencia Yali0B:3029961..3032280 es decir 2319 pb. Se ha eliminado el sitio EcoRI presente en el ORF del gen ADE2 modificando la gaATc en gaATC por mutagénesis dirigida con los cebadores ADE2ES y ADE2ER (tabla 9). Esta base modificada crea una mutación silenciosa ATT en ATC.

El marcador se puede insertar en los dos sentidos. El marcador ADE2ex en el sentido 1 corresponde a JME798 y en el sentido 2 a JME799.

## 2.3 Transformación con el marcador ADE2ex

Para ensayar la utilización del marcador ADE2ex, se ha aislado el marcador ADE2ex del plásmido JME798 (pKS-LPR-ADE2) por digestión I-SceI y se ha insertado en el sitio I-SceI del plásmido JMP62 I-SceI (JME793) para obtener el plásmido JMP62 ADE2ex (JME862). El plásmido JME862 ha sido digerido por NotI y se ha utilizado para transformar la cepa FF-lua mediante el método con acetato de litio. Los transformantes se han seleccionado sobre medio YNBcasa suplementado con uracilo (100 mg/l) y adenina. En la bibliografía, se describe habitualmente en unos mutantes Ade- de diferentes especies de levaduras que los medios selectivos están suplementados con adenina a una concentración de 100 a 200 mg/l. En el caso presente, para los mutantes Ade- antes citados, la concentración necesaria para un crecimiento correcto de los transformantes es de 800 mg/l. En estas condiciones, se obtienen unas tasas de transformación similares a las tasas de transformación obtenidas con el marcador URA3.

3. Deleción del gen LEU2 (marcado Δleu2-958), obtención de las cepas mutantes FF2-lu, FF-2lug, FF2-lua y FF2-luag y construcción del marcador LEU2ΔBamHI.

3.1 Deleción del gen LEU2 (Δleu2-958)

Para obtener estas cepas, se puede proceder de la siguiente manera: a partir del mutante FF-lu, se ha construido la cepa FF2-lu Leu-, Ura-. De manera similar, se pueden construir unas cepas derivadas de FF-lua, FF-lug, FF-luag que presentan la deleción Δleu2-958. A partir del mutante FF-lug, se puede construir la cepa FF2-lug Leu-, Ura-, gly-, a partir del mutante FF-lua, se puede construir la cepa FF2-lua Leu-, Ura-, ade- y a partir del mutante FF-luag, se puede construir la cepa FF2-luag Leu-, Ura-, ade-, gly-.

Por ejemplo, a partir del mutante FF-lu se ha construido la cepa *Y. lipolytica* mutante correspondiente que presenta una deleción del gen LEU2 más importante que para el marcador genético leu2-270. La primera etapa es la construcción de la cepa FF2-lu :: URA3 protótrofa para el uracilo (Leu-, Ura+) por deleción del gen leu2-270 por el casete de interrupción leu2 :: URA3ex transformando el casete NotI procedente del plásmido pPTLeu2-Ura3Ex (JME958) que contiene este marcador y seleccionando las Ura+ sobre YNBcasa. Se seleccionan los auxótrofos para el uracilo (Leu+, Ura-) por escisión del marcador URA3ex transformando con el vector replicativo pRRQ2 que contiene la recombinasa Cre y el marcador LEU2 (Cre-LEU2) y seleccionando los transformantes auxótrofos para el uracilo, Leu+. La pérdida del plásmido pRRQ2 se realiza mediante un cultivo sobre medio rico YPD y mediante el aislamiento de un clon (Leu-, Ura-). Se puede utilizar el mismo método para obtener los mutantes FF2-lua, FF2-lug y FF2-luga.

La representación esquemática de la construcción del mutante FF2-lu se resume en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4: Etapas de transformación requeridas para la producción del mutante FF2-lu

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
a1	FF-lu, Leu-, Ura-JMY195, Po1d	PTLeu2-Ura3Ex	FF-IU+, leu-, Ura+ leu2-PUexT
a2	FF-IU+, Leu-, Ura+, leu2-URA3	Vector pRRQ2, selección Leu+, verificación Ura-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD, aislamiento de Leu-	JMY1516, Lieu-, Ura-, leu2-958 FF2-lu

El casete de interrupción para el gen LEU2 se ha construido por amplificación de la región aguas arriba (región P; Yali0C44989..Yali0C46081, 1092 pb) y de la región aguas abajo (región T; Yali0C47036..Yali0C47932, 897 pb) lo cual permite la deleción del ORF del gen LEU2 (Yali0C46082..Yali0C47035, 954 pb) y que no deja más que una homología muy reducida con el marcador de selección LEU2ex (0 bp con la región P y 207 bp en la región T) con el fin de minimizar las conversiones génicas. El marcador de selección Leu2Ex presentaba una fuerte homología con el marcador genético leu2-270 (401 bp con la región P y 710 bp en la región T) ya que éste corresponde a una simple deleción Stul de 681 bp del gen LEU2. Los marcadores de selección ex se presentan en la tabla 11.

Las regiones P y T se han amplificado con los cebadores P1Leu2, P2Leu2, T1Leu2 y T2Leu2 (tabla 9).

Los cebadores P2 y T1 contienen el sitio raro I-SceI para la inserción del marcador de selección escindible Ura3ex. El cebador T1 contiene también el sitio raro I-CeuI para la inserción del casete de expresión. Los cebadores P1 y T2 contienen el sitio raro NotI para la clonación en pHSS6-NotI (JME800). El fragmento PT se ha clonado en JME800 digerido por NotI y se ha desfosforilado para dar el plásmido pLeu2-PT en la orientación 1 (sentido 1, JME811) o en la orientación 2 (sentido 2, JME812). El sentido se define según la orientación del sitio I-SceI: o bien el sentido 1 con el sitio I-SceI como sentido, o bien el sentido 2 con el sitio I-SceI, como complementario. El plásmido de interrupción pPTLeu2-Ura3Ex (JME958) se ha obtenido mediante la inserción del marcador Ura3ex en el sitio I-SceI del plásmido JME811.

El casete de interrupción se ha obtenido por digestión NotI y purificación de la banda de 3351 pb. Las cepas se han transformado mediante el método con acetato de litio. Los transformantes Ura+ se han seleccionado sobre medio YNBcasa.

3.2 Construcción del marcador LEU2n (LEU2exΔBamHI)

Para la construcción de los casetes de expresión y de los casetes de integración, los marcadores de selección no deben contener los sitios únicos utilizados para la clonación de los genes de intereses (BamHI, HindIII, KpnI y AvrII). Para la construcción del marcador LEU2n (LEU2exΔBamHI), se han utilizado los cebadores Leu2-L1 y Leu2-L2 para crear un "linker" que aporta la modificación ggaatT en ggaatC y que posee el sitio Apal (Tabla 9). El plásmido pKS-LPR-Leu2 (JME509) ha sido digerido por un lado por Apal y Scal y, por otro lado, por BamHI y Scal. Las bandas Apal-Scal de 1471 pb y BamHI-Scal de 3300 pb se han purificado sobre gel de agarosa. Una ligación de 3 vías se

ha efectuado con estas 2 bandas más el "linker" Leu2L1/Leu2L2. Se ha obtenido un plásmido que contiene el nuevo marcador LEU2n modificado LEU2exΔBamHI (JME790).

#### 4. Desarrollo del sistema de integración monocopia aleatorio con diferentes marcadores escindibles

La construcción se ha realizado a partir de los diferentes marcadores escindibles existentes y de los marcadores obtenidos en la presente invención (Tabla 11).

En una primera fase, se han construido los 2 vectores de base denominados I-SceI o JMP61 I-SceI y el JMP62 I-SceI. A partir de los vectores JMP61 leu2Ex y JMP62 leu2Ex que contienen el marcador escindible LEU2, se ha efectuado una PCR de la totalidad del plásmido con un par de cebadores: 62claS y 62claR (Tabla 9).

Se ha utilizado el kit «QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit» de Stratagene que permite efectuar unas mutaciones dirigidas. El principio, basado en la amplificación por PCR, utiliza unos cebadores contruidos específicamente para forzar la mutación del producto de PCR. Habitualmente utilizado para cortas inserciones/delecciones o unas mutaciones puntuales, se ha utilizado este principio con el fin de eliminar el marcador Leu2Ex por recircularización del plásmido en el sitio I-SceI. Estos 2 cebadores se han construido también para eliminar los sitios BamHI y AvrII contenidos en el plásmido JMP61 Leu2Ex aguas arriba del sitio I-SceI y restaurar el sitio ClaI con el fin de permitir el intercambio del promotor por este único sitio. El producto de PCR obtenido es después digerido por la enzima de restricción DpnI que permite eliminar la hebra parental. Esta última, que proviene de una cepa de *E. coli* dam+ está metilada y, al contrario de la hebra nuevamente formada, será reconocida y digerida específicamente por la enzima DpnI. Después de la transformación y del cribado, se han obtenido los vectores JMP61 I-SceI y JMP62 I-SceI (Tabla 12).

Las otras construcciones (Tabla 12) se han realizado a partir de estos 2 plásmidos. Las ligaciones se han efectuado con los plásmidos digeridos por I-SceI y se han desfosforilado, y las bandas purificadas I-SceI de los diferentes marcadores escindibles a partir de los plásmidos pKS-LPR correspondientes (Tabla 11). Para el marcador escindible Leu2, se ha utilizado el plásmido JME790 que contiene el marcador LEU2n (Leu2ΔBamHI).

Tabla 5: Cepas obtenidas:

Cepa	N° colección	Genotipo
<b>FF-lu</b>	JMY 195, Po1d	xpr2-322, leu2-270, ura3-302
<b>FF2-lu</b>		xpr2-322, leu2-958, ura3-302
	JMY 1202	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-PUexT
<b>FF-lug</b>	JMY 1346	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744
	JMY 1407	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, ade2-PUexT
<b>FF-lua</b>	JMY 1409	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, ade2-844
	JMY 1396	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744, ade2-PUexT
<b>FF-luga</b>	JMY 1404	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744, ade2-844
<b>5LAsp1</b>	1 copia	ade2 :: GUT2-Asp
<b>6LAsp1</b>	1 copia	ade2 :: GUT2-Asp
<b>14LAsp2</b>	2 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp
<b>15LAsp2</b>	2 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp
<b>16LAsp2</b>	2 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp
<b>17LAsp2</b>	2 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp
<b>21LAsp2</b>	2 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp
<b>1LAsp3</b>	3 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp leu2 :: ADE2-Asp.
<b>2LAsp4</b>	4 copias	ade2 :: GUT2-Asp lip2 :: URA3-Asp leu2 :: ADE2-Asp ura3 :: LEU2-Asp

#### 5. Construcción de los vectores de base, de clonación y de expresión.

##### 5.1 Vectores de base y de clonación.

La construcción del vector de base se ha realizado a partir del vector JMP62 conservando sólo la parte lanzadera *E. coli* que proviene del plásmido pHSS6. Después de la digestión por NotI del vector JMP62, la banda de 2210 pb que contiene el origen de replicación para *E. coli* y la resistencia a la Kanamicina, se ha aislado y purificado y después se ha religado para formar así el vector de base denominado pHSS6-NotI (JME800).

A partir del vector de base, se ha construido el vector de clonación (figura 2) por ligación de 2 "linkers" y de un fragmento de PCR que contiene las secuencias de terminación de la lipasa LIP2 de *Y. lipolytica* contenida en el vector JMP62. Los "linkers" se han realizado por síntesis de un par de cebador fosforilo en 5', es decir el "linker" 1 con los cebadores link1 y link11 y el "linker" 2 con los cebadores link2 y link22 (Tabla 10). Estos "linkers" crean un multisitio de clonación que contiene respectivamente los sitios ClaI y BamHI para la inserción de un promotor, los sitios BamHI/HindIII y SacII/KpnI/AvrII para la inserción del gen de interés. Se ha introducido también una secuencia



«consensus» en -4 y -1 del ATG: C<sup>4</sup> A C A<sup>-1</sup>. Esta secuencia está presente para los genes de *Y. lipolytica* que codifican para unas proteínas fuertemente expresadas. Así, para una expresión con esta secuencia, la clonación del gen de interés se efectúa por HindIII y sin esta secuencia por BamHI en 5'. El fragmento de PCR (840 pb) que contiene las secuencias de terminación de LIP2 se ha obtenido con los cebadores POX2Xho y Lip2Thc. Este fragmento ha sido digerido por AvrII y NotI para obtener el fragmento de 179 pb que contiene sólo las secuencias de terminación de LIP2. Se ha añadido un sitio único HincII con el fin de permitir el intercambio de estas secuencias de terminación por AvrII y HincII. Se han introducido 2 sitios raros de la enzima de restricción I-CeuI a uno y otro lado del multisitio y de las secuencias de terminación. Este doble sitio I-CeuI permite aislar y purificar el casete de expresión para una clonación en unos vectores de integración.

Se ha realizado una ligación de 3 vías con los 2 "linkers", la banda de 179 pb AvrII/NotI y el vector de base pHSS6 NotI desfosforilado para obtener el vector de clonación denominado pVC (JME829).

### 5.2 Vector de expresión

La construcción del vector de expresión se ha realizado a partir del vector de clonación pVC digerido por ClaI y BamHI. El promotor pPOX2 reducido (1017 pb) se ha aislado y purificado después de la digestión por ClaI y BamHI del vector JMP62 (Tabla 12). Se ha realizado una ligación del pVC y del promotor pPOX2 para obtener el vector de expresión denominado pVC-pPOX2 (JME830), Tabla 6.

Tabla 6: Vectores utilizados para la construcción del vector de expresión.

Descripción	Nombre del vector	Nº de colección
Vector de base	pHSS6-NotI	JME800
Vector de clonación	pVC	JME829
Vector de expresión	pVC-pPOX2	JME830

### 6. Selección de los locus de inserción y principio de construcción de los vectores de integración.

Se han seleccionado los diferentes locus siguientes:

#### 6.1 Locus Leu2-270

Se ha utilizado frecuentemente este locus como diana de integración homóloga por simple «crossing over» (por ejemplo Bordes *et al.*, 2007), pero con este marcador genómico se obtiene una tasa elevada de conversión (corresponde a una pequeña deleción Stul de 681 pb que deja una región 5' de 401 pb (Yali0C:46411..46537) y una región 3' de 710 pb (Yali0C:46528..46948) que permite una doble recombinación con el marcador de selección LEU2 utilizado en los presentes vectores. Así, se observa generalmente una fuerte tasa de conversión durante las transformaciones del casete de expresión que contiene este marcador. Para disminuir la tasa de conversión, se ha elegido insertar en una primera etapa un casete de expresión en el locus leu2-270, con el fin de eliminar estas regiones de homología en 5' y 3'. Así, durante una inserción de un nuevo casete de expresión que contiene el marcador LEU2 en otro locus, la tasa de conversión ha disminuido mucho. Alternativamente, se puede construir una cepa con el marcador leu2-958, tal como se describe en el capítulo 3.

#### 6.2 Locus Ura3-320

La deleción se ha realizado por doble "crossing-over" dejando sólo 21 pb en la posición 5' (Yali0E:3171873..3171893) y 108 pb en la posición 3' (Yali0E:3175134..3175241). El fragmento delecionado (695 pb) ha sido sustituido por el casete de expresión siguiente: promotor del gen XPR2 y el gen SUC2 que codifica para la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* en sentido inverso (3240 pb, Yali0E:3171894..3175133). La integración en este locus Ura3-320 permite eliminar el gen SUC2 que proviene de *S. cerevisiae* en la cepa de producción y efectuar un cribado simple y rápido de los transformantes Suc- (ausencia de crecimiento en medio que contiene sólo sacarosa como única fuente de carbono) tal como se describe en la figura 6.

#### 6.3 Locus Lip2

El gen LIP2 codifica para la lipasa Lip2p de *Y. lipolytica*. Su expresión está inducida en presencia de ácido graso y de triglicéridos (Pignede *et al.*, 2000). En la presente invención, la expresión de las proteínas de interés está colocada bajo el promotor fuerte e inducible pPOX2. Este promotor es también inducible por los ácidos grasos como el ácido oleico. La integración en el locus LIP2 permite invalidar el gen LIP2 y obtener la ausencia de expresión de la lipasa Lip2p en los sobrenadantes de cultivo durante la producción. Además, esto permite efectuar un cribado simple y rápido de los transformantes Lip2- (ausencia de degradación de una emulsión de tributirina visible en el medio agar o ausencia de actividad lipasa en el sobrenadante de cultivo, tal como se describe en la figura 7).

#### 6.4 Locus Ade2

En la presente invención, se han construido nuevas cepas Ade-, así como el marcador de selección Ade2ex. Para la interrupción del gen ADE2 se han amplificado las secuencias P y T. Estas mismas secuencias se han utilizado por lo tanto en los vectores de integración. Así, no ha sido necesaria ninguna construcción suplementaria para este locus.

Si la cepa receptora utilizada es FF-lug, la inserción en el locus ADE2 devuelve la Ade-, lo cual crea una nueva auxotrofia, que puede ser utilizada para introducir una copia suplementaria del gen de interés. Esta interrupción está también asociada a un fenotipo rápidamente identificable (coloración marrón de las colonias interrumpidas en medio rico en placa de Petri, coloración marrón del medio de cultivo).

Esta lista o estas combinaciones de locus/marcador no son exhaustivas. Cualquier otra combinación es posible, preferentemente con un locus cuya interrupción crea un fenotipo rápidamente visualizable que permite un cribado rápido de los transformantes que han integrado correctamente el casete de expresión en el locus. Se puede seleccionar otro locus y otros marcadores o realizar otras combinaciones.

#### 6.5 Principio de construcción de los vectores de integración

El principio de la construcción de los vectores de integración está descrito en la figura 3. Los diferentes casetes de integración en unos locus definidos han sido construidos mediante una metodología idéntica. A partir del ADN<sub>g</sub> de la cepa E150, se ha amplificado la parte promotora denominada P y la parte terminadora denominada T del gen a interrumpir. Los fragmentos P y T deben, preferentemente, tener un tamaño comprendido entre 800 y 1000 pb para obtener una doble recombinación homóloga eficaz en *Y. lipolytica*. Los cebadores utilizados se denominan P1/P2 para el fragmento P y T1/T2 para el fragmento T seguido del nombre del locus (Tabla 9). Los cebadores P1 y T2 contienen un sitio raro 1, en este caso el sitio NotI, para permitir la clonación en el vector de base pHSS6-NotI y también para liberar el casete de expresión. Los cebadores P2 y T1 contienen otros dos sitios raros, los sitios raro 2 y raro 3, en este caso los sitios I-SceI y I-CeuI, respectivamente, lo cual permite la fusión por PCR de los 2 fragmentos y la clonación ulterior del marcador de selección en el sitio raro 2, en este caso el sitio I-SceI y del casete de expresión en el sitio raro 3, en este caso el sitio I-CeuI. La fusión por PCR está por lo tanto bien realizada a partir de una mezcla de los 2 fragmentos P y T purificados y del par de cebadores P1/T2. El fragmento PT obtenido es digerido por NotI y después se clona por ligadura en el vector pHSS6 digerido por NotI y desfosforilado. Los vectores de integración se denominan pPT seguido del nombre del locus (Tabla 7).

Descripción de los fragmentos P y T de los diferentes locus:

Locus Leu2-270: Las regiones amplificadas para la doble recombinación homóloga son para la región P de 1092 pb (Yali0C:44989..46081) y para la región T de 897 pb (Yali0C:47036..47932). La región que se eliminará es de 954 pb (Yali0C:46082..47035). Esta región elimina la totalidad de la región 5' del marcador Leu2 (401pb) y una parte de la región 3' (503pb). Permanece una homología de 207 pb de la región 3' del marcador Leu2.

Locus Ura3-302: Las regiones amplificadas para la doble recombinación homóloga son para la región P de 1197 pb (Yali0E:3170698..3171894) y para la región T de 1013 pb (Yali0E:3175412..3176424). La región que se eliminará es de 3516 pb (Yali0E:3171895..3175411). Esta región elimina la totalidad del casete de expresión pXPR2+SUC2 y la región 3' del marcador Ura3 (280 pb). Permanece una homología de 200 pb de la región 5' del marcador Ura3.

Locus Lip2: Las regiones amplificadas para la doble recombinación homóloga son para la región P de 1123 pb (Yali0A:2185897..2187019) y para la región T de 961 pb (Yali0A:2187883..2188843). La región que se eliminará es de 863 pb (Yali0C:2187020..2187882). Esta región elimina casi la totalidad del gen LIP2. Permanece una homología de la región 3' de 148 pb del gen LIP2.

Locus Ade2: Las regiones amplificadas para la doble recombinación homóloga son para la región P de 920 pb (Yali0B:3029011..3029931) y para la región T de 792 pb (Yali0B:3031871..3032662). La región que se eliminará es de 1939 pb (Yali0B:3029932..3031870) que deja sólo una homología muy reducida con el marcador de selección ADE2ex (O bp con la región P y 415 bp en la región T) con el fin de minimizar las conversiones génicas.

Para cada locus, se han amplificado las regiones P y T con la ayuda del par de cebadores denominado P1/P2 y T1/T2 seguido del nombre del locus (Tabla 9). Después, se ha realizado la fusión PT con el par P1/T2.

A partir de estos vectores pPT, se han introducido diferentes marcadores escindibles por clonación al sitio I-SceI. Este sitio permite una clonación orientada del marcador. Se ha elegido orientar el marcador en el sentido inverso del casete de expresión. Los vectores de integración obtenidos se denominan pPT seguido del nombre del locus seguido del nombre del marcador escindible insertado (Tabla 7).

Las combinaciones locus/marcador se dan sólo a título de ejemplo, son posibles diferentes combinaciones.

Tabla 7: lista de los vectores de integración

Locus	Nombre del vector	Orientación 1-Scel	Nº colección	Marcador	Nombre del vector	Nº colección
<b>LIP2</b>	pPTLip2	Sens 1	JME806	URA3ex	pPTLip2-Ura3ex	JME815
				GUT2-0.5ex	pPTLip2-Gut2-0.5ex	JME816
		Sens 2	JME807			
<b>URA3</b>	pPTUra3	Sens 1	JME809	LEU2nex	pPTUra3-Leu2nex	JME817
		Sens 2	JME810			
<b>LEU2</b>	pPTLeu2	Sens 1	JME811	ADE2ex	pPTLeu2-Ade2ex	JME818
				URA3ex	pPTLeu2-Ura3ex	JME958
		Sens 2	JME812			
<b>ADE2</b>	pPTAde2	Sens 1	JME813	GUT2-0.5ex	pPTAde2-Gut2-0.5ex	JME819
				URA3ex	pPTAde2-Ura3ex	JME844
		Sens 2	JME814	JME814		

5 **7. Principio de construcción de los vectores de integración para la expresión de proteína de interés.**

La clonación de un gen de interés se realiza sólo en 2 etapas de clonación. La primera etapa es una sub-clonación en el vector de expresión pVC para obtener el vector pVC-gen de interés bajo el control del promotor POX2 (pueden ser utilizados otros promotores fuertes tales como por ejemplo el promotor hp4d o unos promotores inducibles). Este vector pVC-gen de interés está digerido por I-CeuI para aislar y purificar el casete de expresión. La segunda etapa es la clonación de este casete de expresión I-CeuI en los vectores de integración. El casete de integración/casete de expresión se aísla y se purifica después de la digestión por NotI antes de la transformación en *Y. lipolytica* (Figura 3).

15 **Ejemplo 2: Construcción y utilización de un casete de integración/expresión para la inserción localizada de un gen que codifica para una proteína de interés terapéutico no producida por *Y. lipolytica*.**

Se ha tomado como ejemplo la proteína L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*.

20 Se introduce el gen que codifica para esta proteína en el vector pVC-pPOX2 en el sitio HindIII/AvrII. Para ello, se realiza una fusión por PCR entre la secuencia preproLIP2 y la parte de la secuencia del gen que codifica para la forma madura de la proteína L-asparaginasa. Las PCR se realizan con los cebadores preproLip2 y Lip2KR para amplificar la secuencia pre-pro-LIP2 y con los cebadores Laspsens y Lasprev para amplificar la secuencia que codifica para la proteína madura. Después, mezclando los 2 productos de PCR obtenidos, se realiza la fusión con los cebadores preproLip2 y Lasprev. El cebador preproLip2 contiene el sitio HindIII y el cebador Lasprev el sitio AvrII para la clonación del producto de la fusión en el pCV-pPOX2. Se obtiene entonces el vector pVC-pPOX2-preproLip2-LAsp (JME898) que contiene el casete de expresión de la proteína L asparaginasa (Tabla 8).

30 A partir de este vector, se extrae el casete de expresión gracias a una digestión por la enzima de restricción I-CeuI y se purifica. Este casete se inserta entonces en los diferentes vectores de integración en el sitio I-CeuI. Los diferentes vectores de integración/expresión obtenidos se describen en la Tabla 8.

Tabla 8: Vector de integración/expresión obtenido:

Descripción	Nombre del vector	Nº colección
Vector de expresión	pVC_pPOX2-LAsp	JME898
Vector Int. locus Ura3	pPTUra3-Leu2nEx-LAsp	JME923
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-0.5Ex-LAsp	JME924
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Ura3Ex-LAsp	JME925
Vector Int. locus Leu2	pPTLeu2-Ade2Ex-LAsp	JME926
Vector Int. locus Lip2	pPTLip2-Ura3Ex-LAsp	JME927
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-10Ex(s1)-LAsp	JME941
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.0Ex(s2)-LAsp	JME942
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.5Ex(s1)-LAsp	JME943
Vector Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.SEx(s2)-LAsp	JME944

35 Los casetes de integración/expresión se obtienen por digestión de la enzima de restricción NotI de los diferentes vectores de integración/expresión. Estos casetes son después extraídos y purificados con el fin de eliminar las secuencias de ADN exógeno *E. coli*.

**Ejemplo 3: Transformación de los casetes de integración/expresión de la proteína L-asparaginasa en *Y. lipolytica*.**

5 Se pueden introducir sucesivamente por ejemplo 4 copias del casete de expresión de la L-asparaginasa en los 4 locus antes citados en la cepa FF-luga.

1 Inserción de la primera copia en el locus ADE2.

10 El primer casete de expresión se ha introducido por transformación de la cepa FF-luga en el locus ADE2 utilizando el casete de integración/expresión PTAd2-Gut2-1.0Ex-LAsp procedente del vector JME941. La selección de los transformantes se realiza sobre un medio selectivo YNBcasa suplementado con uracilo y con adenina y que contiene como única fuente de carbono un 1% de glicerol. Los transformantes obtenidos son insertados en este mismo medio selectivo y se verifica la integración en el locus por PCR utilizando los cebadores Verlade2 y Ver2ade2 que se encuentran aguas arriba y aguas abajo de las secuencias de integración.

15 La tasa de transformación obtenida es de  $8,2 \cdot 10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN transformado. La verificación por PCR de la integración en el locus Ade2 ha mostrado que el 100% de los transformantes han integrado el casete de expresión LAsp de este locus.

20 Se han conservado 2 transformantes denominados 5LAsp1 y 6LAsp1 (tabla 5). Las primeras cifras al principio del nombre dan el número del transformante y la segunda cifra al final del nombre da el número de copia del casete de expresión LAsp.

2 Inserción de la segunda copia en el locus LIP2.

25 El segundo casete de expresión se ha introducido por transformación del transformante 5LAsp1 en el locus LIP2 utilizando el casete de integración/expresión PLip2-Ura3Ex-LAsp procedente del vector JME927. La selección de los transformantes se realiza sobre un medio selectivo YNBcasa suplementado con adenina y que contiene como única fuente de carbono un 1% de glucosa. Los transformantes obtenidos son aislados sobre este mismo medio selectivo y la integración en el locus se verifica por PCR utilizando los cebadores Ver1lip2 y Ver2lip2 que se encuentran aguas arriba y aguas abajo de las secuencias de integración.

30 La tasa de transformación obtenida es de  $1,1 \cdot 10^4$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN transformado. La verificación por PCR de la integración en el locus LIP2 ha mostrado que el 75% de los transformantes han integrado el casete de expresión LAsp en este locus. Alternativamente, la verificación de la integración del casete de expresión en el locus LIP2 se puede realizar por medición de la actividad lipasa, tal como se muestra en la figura 7.

Se han conservado 5 transformantes denominados 14LAsp2, 15LAsp2, 16LAsp2, 17LAsp2 y 21 LAsp2 (Tabla 5).

40 3 Inserción de la tercera copia en el locus LEU2.

45 El tercer casete de expresión se ha introducido por transformación del transformante 15LAsp2 en el locus LEU2 utilizando el casete de integración/expresión Ptleu2-Ade2Ex-LAsp procedente del vector JME926. La selección de los transformantes se realiza sobre un medio selectivo YNBcasa que contiene como única fuente de carbono un 1% de glucosa. Los transformantes obtenidos son aislados sobre este mismo medio selectivo y se verifica la integración en el locus por PCR utilizando los cebadores Ver1leu2 y Ver2leu2 que se encuentran aguas arriba y aguas abajo de las secuencias de integración.

50 La tasa de transformación obtenida es de  $1,6 \cdot 10^4$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN transformado. La verificación por PCR de la integración en el locus LEU2 ha mostrado que el 20% de los transformantes han integrado el casete de expresión LAsp en este locus.

Se ha conservado 1 transformante denominado 1LAsp3 (Tabla 5).

55 4 Inserción de la cuarta copia en el locus URA3.

60 El cuarto casete de expresión se ha introducido por transformación del transformante 1LAsp3 en el locus URA3 utilizando el casete de integración/expresión PUra3-Leu2nEx-LAsp procedente del vector JME923. La selección de los transformantes se realiza sobre un medio selectivo YNB que contiene como única fuente de carbono un 1% de glucosa. Los transformantes obtenidos son aislados sobre este mismo medio selectivo y se verifica la integración en el locus por PCR utilizando los cebadores Ver1Ura3 y Ver2Ura3 que se encuentran aguas arriba y aguas abajo de las secuencias de integración.

65 La tasa de transformación obtenida es de  $5,25 \cdot 10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN transformado. La verificación por PCR de la integración en el locus URA3 ha mostrado que el 87% de los transformantes han integrado el casete de expresión LAsp en este locus, el 87% de los transformantes son Ura- (figura 6).

Se ha conservado 1 transformante denominado 2LAsp4 (Tabla 5).

5 Esta última cepa contiene bien por lo menos una copia suplementaria (véase la figura 5 (gel electroforesis) y la figura 8 cuantificación por RT-qPCR.

5 Variante del procedimiento de inserción:

10 La invención también puede ser realizada según las etapas siguientes: en una primera fase, las 4 (por ejemplo) transformaciones se realizan unas detrás de otras. En una segunda fase, se realiza el cribado de las inserciones con la ayuda de los diferentes marcadores. De allí el interés, si no se utiliza el sistema Cre-lox, de detener tantos sistemas de cribado diferentes como copias a integrar.

**Ejemplo 4: Análisis de la expresión de L-Asparaginasa en función del número de copia integrada.**

15 La expresión de L-Asparaginasa se ha analizado en producción a partir de los diferentes transformantes obtenidos que contienen 1 a 4 copias. La producción se ha realizado en matraz de 250 ml que contiene 25 ml de medio rico de compuesto de Yeast Extract al 1%, de Bacto Tryptone al 2%, Glucosa al 1%, tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,8 y de una emulsión ácido oleico al 2% (denominado Y1T2D1O2). El ácido oleico sirve de inductor del promotor pPOX2. La expresión se analiza por gel de electroforesis en condiciones desnaturizante y reductora a partir del sobrenadante de los cultivos. El gel de electroforesis se revela por coloración con azul coloidal y por transferencia western utilizando unos anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra L-Asparaginasa. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 5.

**Ejemplo 5: Cribado sobre placa de los transformantes obtenidos por inserción del casete integración/expresión en el locus URA3.**

25 Como se ha descrito anteriormente, la inserción en el locus URA3 permite eliminar el gen heterólogo SUC2 que codifica para la invertasa de *S. cerevisiae*. Los transformantes que han integrado el casete de expresión se vuelven entonces Suc2-. Ya no son capaces de crecer sobre sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes se extienden en estría sobre 2 medios ricos: YPD (glucosa al 1%) y YPS (sacarosa al 1%). Los resultados de este análisis se presentan en la figura 6. Para este cribado, se confirman los resultados obtenidos mediante análisis por PCR con los cebadores Ver1Ura3 y Ver2Ura3.

**Ejemplo 6: Cribado de los transformantes obtenidos por inserción del casete integración/expresión en el locus LIP2.**

35 Como se ha descrito anteriormente, la inserción en el locus LIP2 permite eliminar el gen LIP2 que codifica para la lipasa lip2p extracelular de *Y. lipolytica*. Los transformantes que han integrado el casete de expresión se vuelven entonces Lip2-. Durante una producción en un medio que contiene un inductor como el ácido oleico, los transformantes no segregan ya la lipasa en el sobrenadante de cultivo. El cribado se efectúa por cultivo en un medio de producción Y1T2D1O2 durante 48 horas a 28°C y por una agitación de 180 rpm. La presencia de la lipasa en el sobrenadante se detecta mediante un ensayo enzimático en microplaca a partir de 20 µl de sobrenadante. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 7. Mediante este cribado, se confirman los resultados obtenidos por análisis por PCR con los cebadores Ver1Lip2 y Ver2Lip2.

**Ejemplo 7: Análisis de los transformantes obtenidos por RT-qPCR.**

50 El número de copias integradas se puede analizar por una PCR cuantitativa en tiempo real por amplificación específica de un amplicón (150 pb) del gen que codifica para la L-Asparaginasa. A partir de ADNg de los transformantes obtenidos, se ha efectuado una RT-qPCR con la ayuda de los cebadores LAsp1 y LAsp2 específica del gen que codifica para L-Asparaginasa y de los cebadores Act4 y Act5 específica del gen que codifica para la actina de *Y. lipolytica*. Esta RT-qPCR se ha realizado con la ayuda del kit LightCycler Faststart DNA Master SyBR Green I (Roche). El amplicón de la actina permite ser un gen denominado doméstico cuya expresión es conocida por no ser modificada en las condiciones ensayadas, y en este caso un gen presente en única copia en el genoma. Así, los resultados se normalizan con este amplicón. Se ha efectuado también una RT-qPCR con la ayuda de los cebadores Lip2-1 y Lip2-2 específica del gen que codifica para la lipasa Lip2p de *Y. lipolytica* para verificar la ausencia del gen a partir del segundo casete de expresión integrado en el locus LIP2. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 8.

60 Tabla 9: Listas de los cebadores utilizados para los casetes de interrupción, las verificaciones y la construcción de nuevos marcadores.

	Cebador	5'-3'	S/R	Sitios
Leu2EX	LEU2-L1	GATCTGCTAGTGTATAAGACTCTATAAAAAGGGCC	S	ΔBamHI
	LEU2-L2	CTTTTATAGAGTCTTATACACTAGCA	R	ΔBamHI

ES 2 553 383 T3

	Cebador	5'-3'	S/R	Sitios
Marcador GUT2	PG3PTS	CCGGAATTCCTGACCAGTCTCACATCCGACC	S	EcoRI
	PG3PTR	CCGGAATTCTAAAGCAGATACTCAACAACCTCAGCAATAGTC	R	EcoRI
	G3PB1S	GGAGCTACCGGCTCCGGTATCGC	S	ΔBamHI
	G3PB1R	GCGATACCGGAGCCGGTAGCTCC	R	ΔBamHI
	G3PB2S	CGGAAACGCTGGATCTTTCAACATCAAGGCC	S	ΔBamHI
	G3PB2R	GGCCTTGATGTTGAAAGATCCAGCGTTTCCG	R	ΔBamHI
	G3PES	GGAGCAGGAGTTCAACACCGGTGTCCG	S	ΔEcoRI
	G3PER	CGACACCGGTGTTGAACTCCTGCTCC	R	ΔEcoRI
ΔGUT2	G3PD-P1	GCAGATCCACTGTCAAGCCG	S	
	G3PD-P2	GCTAGGGATAAACAGGGTAATGCGGTAGGAAAGAGAAGTTCCGGC G	R	I-SceI
	G3PD-T1	GCATTACCCTGTTATCCCTAGCCGGACTATTTCCCCGCAGC	S	I-SceI
	G3PD-T2	GCAGCCAGCAGCAGTAGTAG	R	
	G3PD-Ver1	GAATGACGGGGGCAACGCAG	S	
	G3PD-Ver2	CAGCAGCCACAAATAGCAGACTGCC	R	
pGUT2-1.0 y 1.5	P1KB	CCGGAATTCCTGACAACGGATGATGCTGTACATGACG	S	EcoRI
	P15KB	CCGGAATTCCTGTTGGCATGCACAGCTCCACTCAACG	S	EcoRI
	PNHE1	TCCCGTAGCCGAGGTATGCAAGGACGAGTGC	R	NheI
Locus ADE2	P1ADE2	ATAAGAATGCGGCCGCGGAGCTGAGAGCCGATACCAAGGGAT GCGAG	S	NotI
	P2ADE2	CATTACCCTGTTATCCCTACAGACACAGGTCCCAGGCGTCCGTT CTCG	R	I-SceI
	T1ADE2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAACATAACGGTCTAAGGTAGCGACCTCG GAAACCACTCTGCCAGTCAATCGGTGTC	S	I-SceI/I-CeuI
	T2ADE2	ATAGTTTAGCGGCCGCGGAAGCGTGTCAACGACATGTTCCCTCT TCATACC	R	NotI
	Ver1Ade2	CGACGATAGAGCAGGTCTCACTOTTGGGAATGCTG	S	
	Ver2Ade2	CTACAGTGACGAAGTGGACATCCCGGCTTGGACTG	R	
Marcador ADE2	ADE2S	CGCGAATTCGCCTGCTTGAAGAAGTGAGTGGTATGCTCGG	S	EcoRI
	ADE2R	CGCGAATTCATTGCCAGCCTGTAAAAGACAAGATGACC	R	EcoRI
	ADE2ES	GCTGGCCATCCGAATCCTGGCTTACGACGCC	S	ΔEcoRI
	ADE2ER	GGCGTCGTAAGCAGCCAGGATTCGGATGGCCAGC	R	ΔEcoRI
Locus Lip2	P1Lip2	ATAAGAATGCGGCCGCGTGGTACGTTTCGTCGCATCGGACGAG	S	NotI
	P2Lip2	CATTACCCTGTTATCCCTAGAGAGCTGGTACTTGGGTATCAATTG AGG	R	I-SceI
	T1Lip2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAACATAACGGTCTAAGGTAGCGACCTGA TCCACCCTCCTCTCTCCAACG	S	I-SceI/I-CeuI
	T2Lip2	ATAGTTTAGCGGCCGCGTGGACACAAGGAAGTATGCGGTGCTCG	R	NotI
	Lip2Ver1	CTCTGTCAGTGTTCGGATAAGTCCTTAGATCACC	S	
	Lip2Ver2	CCTCACTTCTGTCACAGATGATGCATTCAACAC	R	
Locus Leu2	P1Leu2	ATAAGAATGCGGCCGCGACACTACTCTGGCTACAGCTTGCGGTA CTG	S	NotI
	P2Leu2	CATTACCCTGTTATCCCTAGCTCGAATAACATTCACAGGCTTGGT G	R	I-SceI
	T1Leu2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAACATAACGGTCTAAGGTAGCGA GGTGT GTTTGTAGTGGAGGACAGTGGTACG	S	I-SceI/I-CeuI
	T2Leu2	ATAGTTTAGCGGCCGCGTACTGAACCGACTTTGGTGCTTGCACT C	R	NotI
	Leu2Ver1	CTCCACGCTAATGCCCATCATACTCTGTTTGGC	S	
	Leu2Ver2	CCTGGCGTTACAAAGCCGAGGGAGACAGCCTTGAC	R	
Locus Ura3	P1Ura3	ATAAGAATGCGGCCGCGGTGACACTGCACTATTGGTTTGCTTCT GATG	S	NotI
	P2Ura3	CATTACCCTGTTATCCCTAGTCGAGCTTCGTAGGAGGGCATTITG GTGG	R	I-SceI
	T1Ura3	CTAGGGATAACAGGGTAATTAACATAACGGTCTAAGGTAGCGATACGG AGATGCTGGGTACAAGTAGC	S	I-SceI/I-CeuI
	T2Ura3	ATAGTTTAGCGGCCGCGCTATGCTACGAGCGTCCGATTACCCACA G	R	NotI
	Ura3Ver1	GGCACACTGCTCACTATCGCAGGCTGCAACAATG	S	
	Ura3Ver2	CCTGACTCGTCTCGATACTCAAGACCTCATTGACGC	R	

Tabla 10: Lista de los cebadores utilizados para la construcción del vector pVC y la PCR cuantitativa, RT-qPCR.

	Cebador	5'-3'	S/R	Sitios
<b>Poli linker pVC</b>	Link1	GGCCGCTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCG	S	
	Link11	CCGAATCGATTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTAGC	R	
	Link2	AATCGATTCCGATCCCACAATGAAGCTTCCCCGCGGTAC	S	
	Link22	CTAGGTACCGCGCGGAAGCTTCATTGTGGGAT	R	
	Lip2Thc	TATCAAATGCGGCCGCTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGT TAACACGATTTCGATTTGTCTTAGAGGAACGC	R	NotI
	POX2Xho	GAGTAATGCTCGAGTATCGAAGTCTTGTACC	S	XhoI
<b>JMP62 IScel</b>	62claS	GCGATATTACCCTGTTATCCCTAGAATCGATTCCCACAAGACGAACAAGT G	S	
	62claR	CACTTGTTTCGTTCTTGTGGGAATCGATTCTAGGGATAACAGGGT AATATCGC	R	
<b>Gen LAsp</b>	preproLi p2	CGCGGATCCCACAATGAAGCTTTCCACCATCCTTTTCACAGCC TGCGCTAC	S	BamHI HindIII
	Lip2KR	TCGCTTCTGGAGAACTGCGGCCTC	R	
	LAspsen s	GAGGCCGAGTTCTGCAGAAGCGAGCCGACAAGCTGCCAACATTGTGAT TC	S	
	LAsprev	CCACCTAGGCTAGTAGGTGTGGAAGTACTCCTGGATG	R	AvrII
<b>qPCR Lip2</b>	LIP2-1	TACTCTTGGTCAGCCCAT	S	
	LIP2-2	AGAAGGGCACTTGAGGGA	R	
<b>qPCR Act</b>	Act4	TATTGCCGAGCGAATGC	S	
	Act5	CTTGGAGATCCACATCTGC	R	
<b>qPCR LAsp</b>	LAsp1	GCTGAACGACCGAATTGG	S	
	LAsp2	GTGGTGTGCAGCTTGTGTC	R	

Tabla 11: Lista de los marcadores escindibles construidos.

5

Marcador	Nombre del vector	N° colección
ADE2	pKS-LPR-Ade2 (sentido 1)	JME798
	pKS-LPR-Ade2 (sentido 2)	JME799
GUT2-0.5	pKS-LPR-Gut2-0.5 (sentido 1)	JME792
GUT2-1.0	pKS-LPR- Gut2-1.0 (sentido 1)	JME919
	pKS-LPR- Gut2-1.0 (sentido 2)	JME920
GUT2-1.5	pKS-LPR-Gut2-1.5 (sentido 1)	JME921
	pKS-LPR- Gut2-1.5 (sentido 2)	JME922
LEU2	pKS-LPR-Leu2 (sentido 2)*	JME509
LEU2n	pKS-LPR-Leu2ΔBamHI (sentido 2)	JME790
URA3	pKS-LPR-Ura3 (sentido 1)*	JME507
HYG	pKS-LPR-hph (sentido 2)*	JME508

\* Fickers *et al.*, Journal of Microbiological Methods 55 (2003) 727-737

Tabla 12: Lista de los vectores de integración aleatoria, series JMP61 y JMP62.

Nombre del vector	N° colección
JMP61 I-Scel	JME793
JMP61 Leu2nEx	JME794
JMP61 Ura3Ex	JME795
JMP61 HygEx	JME796
JMP61 Gut2-0.5Ex	JME797
JMP61 Ade2Ex	JME861
JMP62 I-Scel	JME801
JMP62 Leu2nEx	JME802
JMP62 Ura3Ex	JME803
JMP62 HygEx	JME804
JMP62 Gut2-0.5Ex	JME805
JMP62 Ade2Ex	JME862

10 **Listado de secuencias**

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) NICAUD, Jean-Marc FUDALEJ, Franck NEUVEGLISE, Cecile BECKERICH, Jean-Marie

15 <120> PROCEDIMIENTO DE INTEGRACIÓN LOCALIZADA DE MÚLTIPLES COPIAS DE UN GEN DE INTERÉS

EN UNA CEPA DE YARROWIA

<130> 354141D26198

5 <150> FR 0850736  
<151> 2008-02-05

<160> 77

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 4844  
<212> ADN

15 <213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 1

```

acagtatcat taggaaaggg gtgacactgc actattgggt tgcttetgat gatacgtatg      60
aatacgatgg tatcttgata cagagtcttg catacattaa ttctgaaact agagcacagc     120
aacagctccc aaatgagcat tcccctgaag cccatcaaaa ctgcaccaca aatttgatcc     180
catattacca ttttaaagca attgttaaca agatactact gtagaaaact gattaaacat     240
tcgtaacttg cctgtggctc gacttacagc caaatgttcg cggcaaaatt tgaatatttt     300
gcacacttat tgtcccaaaa ccaataatg ccaacaaaat ccgatatagt gtaggggcta     360
tcacatcaag ctctcatcaa gaatacttct tgagaaccgt ggagaccggg gttcgattcc     420
ccgtatcgga gtgtttattt tttgctcaac cataccctgg ggtgtgttct gtggagcatt     480
ctcacttttg gtaaacgaca ttgcttcaag tgcagcggaa tcaaaaagta taaagtgggc     540
agcgagtata cctgtacaga ctgtaggcga taactcaatc caattacccc ccacaacatg     600
actggccaaa ctgatctcaa gactttattg aaatcagcaa caccgattct caatgaaggc     660
acatacttct tctgcaacat tcaacttgac cctaaagttg gtgagaaatg gaccgacaag     720
acatattctg ctatccacgg actgttgcct gtgtcgggtg ctacaatacg tgagtcagaa     780
gggctgacgg tgggtgttcc caaggaaaag gtcgacgagt atctgtctga ctcgtcattg     840
ccgcctttgg agtacgactc caactatgag tgtgcttggg tcaacttgac gatacattct     900
tcgttgaggg ctgtgggtct gacagctgcg ttttcggcgc ggttggccga caacaatata     960
agctgcaacg tcattgctgg ctctcatcat gatcacattt ttgtcggcaa aggcgacgcc    1020
cagagagcca ttgacgttct ttctaatttg gaccgatagc cgtatagtcc agtctatcta    1080
    
```



ES 2 553 383 T3

taagttcaac taactcgtaa ctattacat aacatatact tcaactgcccc agataaggtt 1140  
 ccgataaaaa gttctgcaga ctaaatttat ttcagctctcc tcttcaccac caaaatgccc 1200  
 tctacgaag ctcgagctaa cgtccacaag tccgcctttg ccgctcgagt gctcaagctc 1260  
 gtggcagcca agaaaaccaa cctgtgtgct tctctggatg ttaccaccac caaggagctc 1320  
 attgagcttg ccgataaggt cggaccttat gtgtgcatga tcaaaaccca tatcgacatc 1380  
 attgacgact tcacctacgc cggcactgtg ctccccctca aggaacttgc tcttaagcac 1440  
 ggtttcttcc tgctcgagga cagaaagttc gcagatattg gcaaacactgt caagcaccag 1500  
 taccggtgtc accgaatcgc cgagtggctc gatatcacca acgcccacgg tgtaccgga 1560  
 accggaatca ttgctggcct gcgagctggt gccgagggaaa ctgtctctga acagaagaag 1620  
 gaggacgtct ctgactacga gaactcccag tacaaggagt tcctagtccc ctctcccaac 1680  
 gagaagctgg ccagaggctc gctcatgctg gccgagctgt cttgcaaggg ctctctggcc 1740  
 actggcgagt actccaagca gaccattgag cttgcccgat ccgaccccga gtttgtggtt 1800  
 ggcttcattg cccagaaccg acctaagggc gactctgagg actggcttat tctgaccccc 1860  
 ggggtgggtc ttgacgacaa gggagacgct ctccggacagc agtaccgaac tgttgaggat 1920  
 gtcattgtcta ccggaacgga taccataatt gtcggccgag gtctgtacgg ccagaaccga 1980  
 gatcctattg aggaggccaa gcgataccag aaggctggct gggaggctta ccagaagatt 2040  
 aactgttaga ggttagacta tggatatgta atttaactgt gtatatagag agcgtgcaag 2100  
 tatggagcgc ttgttcagct tgtatgatgg tcagacgacc tgtctgatcg agtatgtatg 2160  
 atactgcaca acctgtgtat ccgcatgac tgtccaatgg ggcattgtgt tgtgtttctc 2220  
 gatacggaga tgctgggtac agtgctaata cgttgaacta cttatactta tatgaggctc 2280  
 gaagaaagct gacttgtgta tgacttattc tcaactacat ccccagtcac aataccacca 2340  
 ctgcactacc actacaccaa aacctgatc aaaccaccca tggacttcct ggaggcagaa 2400  
 gaacttgta tgaaaaagct caagagagag aagccaagat actatcaaga catgtgtcgc 2460  
 aacttcaagg aggaccaagc tctgtacacc gagaacagc cctttgtcga cgaagctcta 2520  
 aagctgaaac gggacatcga aaagtggag aagtcaatct ggaaactaca cgtagaaaac 2580  
 agacaccatc tccaacaagt acaggacttc aaatttgac tgaagacatt ctgtgggtgg 2640  
 agccataagt aacaatcgcc tgctccagga acttaaaaaa gaggcattat aggcccttc 2700  
 atctgaatat tctttgagta ccaactgccg ccaactcccc aatcgtaat tagtgttatc 2760  
 tattctatct atgctattag cacatattta tcatgtgctg ctgttatgta cgggttcaat 2820  
 atacaaatgc ttagtcctca aacaccttca taggtgggtc gtcttcctgg ccaaactgaa 2880

ES 2 553 383 T3

ttctcatgat ttcaaacacg aacagacega tagacgtaga cggaaagcga ctgagggtcg	2940
tccagccaca accatggtat aggtatctgg gccaaactcaa ccgacagacc ttccggatgt	3000
tattggctgt atgcagagtc tcaacgtagg ctccggtagta gagatggata cccgggaaga	3060
ttctgtatct aagagtagta aaacatctaa tagaaaagtt gacggcttta ctccatccct	3120
taccaaactt cacaagaagt gaatgcgttc tgggaagagt ctctccagc gtttcagaca	3180
gttccacat aagagggttt ctgtggtgaa tccgacgctc gtagcataga aatggtgact	3240
ggaaaggaga ggccgggactg gcctgatggt ttattcgctc tccaagtttg ttctgtgtct	3300
tttgcctctt ggatcgggta gcttccagtt gttttcttgc gtcaatgagg tcttgagtat	3360
cgagacgagt caggtagatg cctgcagct tctgaagagg aaactgaacc acatgcagtg	3420
agatggtggc tgctgctcca gctacaagga tgctgaaagg tgctaggacc ttggtgacga	3480
tgctttttcc attctcatca aagcctgaag gatgttctct gagacgatca gcatacagcc	3540
aettggcata ggacctgtac cacgatccct taaccatttc gaacgtggca aaaaagacc	3600
caaaaccag actctctttg acaactgaca acgtaaagcc agcaaagaca cctggtgcac	3660
ctggttgggc caacttctcc attccatagg accacataga gggcaactgt ttggtcttga	3720
gcacttctgc tatcgaagaa cgctgtaga tggcgtcgat tgggtgctgca gctactgct	3780
gggctgctcc agcgactgct ccggcacaaa acgtctgttt gaacgtgtat cgatgaggca	3840
tgagttcacc gatgatgat ttccatgag agccgtccat tccctgggta tcataccatg	3900
atttccttag cagcagttgt cgttgggtgt cgtctctctc atcctccttt tgcggtctt	3960
tctctgatt gaataatggt agacatcca gatatgtgga gtacaatacc agtcctacgg	4020
ccgagttcgc caataagggg ggcagcaatt gatttggat aaaaccccag ccatgctgtt	4080
tgactgcggt ggcaatcaga gccggactgc tgtgtgtttt gaagctcaa ggtttgtcgc	4140
tgtttgaga cagcgcctgt ggaagcgtc agtagtcgac tctggtaggt cgaaagagct	4200
tgacaggcac acggatgtaa aatgtgaaga gctgggatgc gagcgcgca gtaccggccg	4260
tcgtagctcc aataatccgg gccgagcttg gtttccatgc ttcggtattg ttttcgtgag	4320
gttcggtgaa ttccggaacc tcgggcagaa atcccggaac gtcgcccggc tcgattttct	4380
gcatgaggcc tagaaact ctccagtgtc gcgggacgtg aggaacgggc ttctatctgc	4440
tgagcgatat caggtagctg tcgtgcttgc ggttgtccag agatccaaa cttttgcgat	4500
gcgtcagggc cgcacagttt accgacaacg gaggagtga aaacgtggg gaacagggca	4560
gtttgtgtgg gtgggtcggc gagtccgaat gatgattttg tatcgttaca gattgcgtgg	4620
ggtggagatt aatatggctg ctcgaaaatt gctcgtgtcg cgttactgag aggcagagta	4680
catgtacgag agctctctctg tctctactcc ttcacctctt taatggtgct gtacatatac	4740
gcggtatgat agatgtggtc aggtggtgga tttgggaatg aaggtcgggt tgggctcggg	4800
agtggtaatg agtgtcatgg gtgaggctta agtggcgaga gatc	4844

<210> 2  
 <211> 968  
 <212> ADN  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 2

5

10

ES 2 553 383 T3

gaattccgtc gtcgcctgag tcatcattta tttaccagtt ggccacaaac ccttgacgat 60  
ctcgtatgtc ccctcogaca tactcccggc cggctgggta cgttcgatag cgctatcggc 120  
atcgacaagg tttgggtccc tagccgatac cgcactacct gagtcacaat cttcggaggt 180  
ttagtcttcc acatagcagc ggcaaaagtg cgtatatata caagagcgtt tgccagccac 240  
agattttcac tccacacacc acatcacaca tacaaccaca cacatccaca atggaacccg 300  
aaactaagaa gaccaagact gactccaaga agattgttct tctcggcggc gacttctgtg 360  
gccccgaggt gattgcccag gccgtcaagg tgctcaagtc tgttgctgag gcctccggca 420  
ccgagtttgt gttcagggac cgactcattg gaggagctgc cattgagaag gagggcgagc 480  
ccatcaccca cgctactctc gacatctgcc gaaaggctga ctctattatg ctcggtgctg 540  
tcggaggcgc tgccaacacc gtatggacca ctcccgacgg acgaaccgac gtgcgacccg 600  
agcagggctc cctcaagctg cgaaaggacc tgaacctgta cgccaacctg cgaccctgcc 660  
agctgctgtc gcccaagctc gccgatctct cccccatccg aaacgttgag ggcaccgact 720  
tcatcattgt ccgagagctc gtcggaggta tctactttgg agagcgaag gaggatgacg 780  
gatctggcgt cgcttcogac accgagacct actccgttcc tgaggttgag cgaattgcc 840  
gaatggccgc ctctctggcc cttcagcata acccccctct tcccgtgtgg tctcttgaca 900  
aggccaacgt gctggcctcc tctcgacttt ggcgaaagac tgttactcga gtcctcaagg 960  
acgaattc 968

<210> 3

<211> 1698

5 <212> ADN

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 3

atggactcga aaacaattgg tattcttggg ggaggtcagc tgggcccgaat ggtcgtggag 60  
gctgcccact gactcaacgt caagactgtc attctagacg cccccaactc tcccgccaaa 120  
cagattcatg ctggagagca tgctgatggc tccttcaagg accctgccga cattgctaag 180  
10 cttgcctcca agtgcgacgt cataaccgtt gaaattgagc atgtgaacgc cgacactctg 240

ES 2 553 383 T3

gcccgatctcc agaagactgg tgtcgagggt cacccttctc ctgagaccat ccgaattatc 300  
caggacaagt accgacagaa ggagcacctg atctcccacg gcattcccgt tgccgaatcc 360  
tacgaggtea ccgagtctac tgaggctgcc cttgtcgttg ctgctgaaaa ggtcggctat 420  
ccttgtgttg tcaaggccaa gactcttgct tacgatggta gaggcaactt cgttcttaag 480  
ggfccagaga atgtcaagga agctcttgag ttccctctccg accgacctt gtacgtagag 540  
aatgggtgc ccttcgtcaa ggagctcgt gttatggttg tccgatctac cgacggaacc 600  
actgttgctt accccacgt cgagactgtt cagaaaaaca acatctgcca tactgtctac 660  
gccccgctc gagacgttc tccttcacc ctgtacgagg ctcagctcgt tgccgagaac 720  
gccattaagt ccttcactgg cgttggtatc tttggtgtcg agatgttctt gctcgaaaac 780  
ggcagcattg ttctcaatga gattgtcctt cgaccccaca actccggtca ttacacaaca 840  
gatgcctgct ccacctcgca gtttgaggcc catgtccgag ccattcttgg tctgcctctt 900  
ttccccgaga tggcccagat gcgaacagca gacactcatg ccattatgct gaacattcta 960  
ggaggtgaca agcccgacag cgagcttgag tactgcaagc ggtcacttcc cgtacctggg 1020  
tccaccatcc atctctacgg caagaccacg agaccggagc gaaagatggg acacatcaac 1080  
attgttgcta gcagcatgga cgaatgcgag cgacggctgg ccaaaatctc tggagaggac 1140  
atcgaggagg caccaaagac tgtcgagggt gtagcaggaa cctctaagac ccccctcgtg 1200  
tctatcatta tgggtcggga ctccgatctt aaggtcatgt ctgccggagc cgacatcctg 1260  
cgaaatttg acattccctt cgaactgacc attgtgtctg cccaccgaac cgcccaccga 1320  
atggctaaat ttgcccgtga ggttgccagc cgaggtgtca aggctgtcat tgccggagct 1380  
ggaggagccg ctcaccttcc cggaatggtt gcctcggaaa ccaactctgc agtcatcgtt 1440  
gtccccgtta agggctcctc tctggacgga gttgactctc tctactccat tgtgcagatg 1500  
cctcgaggca tccccgtggc caccatgggt gtcaacaact ccaccaatgc tgctctgctg 1560  
gccatccgaa ttctggctgc ttacgacgcc accctacaca ttcgactggc cgagtacatc 1620  
aagaacatgg agaaggagg tcttgccaag gccgacaagc tcgagaccat tggatacgag 1680  
cagtacctca accaatag 1698

<210> 4  
<211> 1839  
5 <212> ADN  
<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 4

ttatttgccc ttgggggtaa ggcccatgga gtagaggtae tcgacaccgg tgttgaattc 60  
10 ctgctccttt cgagcctcgt cccactggag ctccttgccc atgatctcaa tgacctcagg 120

ES 2 553 383 T3

gagagcctcg taggcggcag cggcgtaag gaaagcaaga cgagttcgtc gagcaaggaa 180  
 gtcgatggcg gtggtggcat actcgtactt catagagtac ttgcactcgg catcgaggta 240  
 ggggtagggg tacaggattc gcttacccctt tgtgagagta gactggggga tcacaccggg 300  
 ttcgggggtg ggcacctcag caagagaagc aacggtgaaa gctcgagatc cgtagtcttc 360  
 agaaaggtgc ttagcaacct cggggtcaag gtccctcctgc tggatcagat caatgtaagt 420  
 gagaggagtc cagtccttag caccgatgag cttgacgtct cgggtgacgg ccttggcgga 480  
 gatttcaggc ttgagaccga acttggcaat gcaggcatcg acagtctcct cagccatctg 540  
 tcggtaagtg gtccactttc cggcagcaat ggtgacaaga ccagactcgg agtaggtgat 600  
 gagatggttt cggacaagag actcgggtgtt cttggcgtgg gggccccgga caaggggtcg 660  
 gattccggac caggcggcca gaacgtcctc tcgtcgcaca tcaaccttgc cctcaacgta 720  
 gtgtcggacc tcgttgagaa tgaagtcaat gtccctcctcg gaggggatag ggtagcagt 780  
 gatcttgta ggtcgtcag tagtaccggc aaggggtgtt cctcggcagg ggaggaagaa 840  
 gataactcgg ccgtcagaag tagcggggtc aaggagtccc atcttcttgg gggagttagta 900  
 accggggaga atgatgtgaa caccggagga aggagcacag atctccttgg tgttcttgc 960  
 gtccalcigt cgcagagagt cagtgaaggg tccagtagca ttaacgacac acttggcctt 1020  
 gatgttgaag gatccagcgt tccgtcagt atccttggca acaacaccgt tgagctggcc 1080  
 attggcgcc ttggtgagct cggtgacctc gcaatggttc aggatggtgg cacccttctc 1140  
 aacagcagtc ataataagag aaacgttcat tcgagagtcg ttctgggagc catcatagta 1200  
 gacaatggcg cccttgagct tgcacatcga aagcatgggg aaggcatcga gagcacggga 1260  
 tcgggagagc atgtaagagg actcgaggtt ctgtcggccg gcaagcagat cgtagcactt 1320  
 gacaccatc cagaagtagg gaagctgcca ccagggttag acggggatca tgatgggcag 1380  
 agcaaaggtg aggtggggag caatgtcgag gaagacctt cgctcgtgca gggcctcctt 1440  
 gaccagctcg tactggttgt agtcgaggtt ccaacacagc ttctcgaggt atcggacacc 1500  
 tccgtggatg agcttgggtg atcgggacga ggttccgag gagaaatcgt ctgctcgac 1560  
 cagagcaacc ttgaggcctc gtgtgacagc gtcgagggcg ataccggatc cggtagctcc 1620  
 tccaccaaca acgacgagat caaactcctc ggtcttcac ttctcgagct gggcggctcg 1680  
 agaggggggc tcggcggcca cggggggcac tgtgaatttg tgcttcttgt ggagctcctc 1740  
 ctgggcctgg gcaggcacag acagggcgac ggctccagcg ccagcggctg ccacggcggc 1800  
 ggcagcagcc cacgcgggtt ttcgaatggt tctgaacat 1839

<210> 5  
 <211> 5304  
 <212> ADN  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

5

<400> 5

ES 2 553 383 T3

gatatcggta gcaaacagac acgaagaaga ggccttgag aatttgaaa caacatccat 60  
tcgtgctcct tgtttctgct tgccatgcaa atgcaacag gggataccgg gctgcagagt 120  
tcggaaggtc tcgtagacgt atcgcacctg ttttgatgaa ctgaagaaaa cgatgatcct 180  
gaacttggtg tgtgttctca gaaacccca cagtgtgtcc agcttgtctt gcagctccac 240  
gcagacatag ttctgttcca ggttcttggg tgtgctggaa gtggtgtccg ggttggcggg 300  
gatgtacttg gggtcggcga gtgacaaaac ggccagatca ctgacgctct tggctctgtg 360  
tgcgctgaaa agcagagtct gtctgtccac aggcaggtt tccaaaatgg catccatgg 420  
cttctgaaa cccatatcga ggattcgatc ggctcgtcc agcaccagca tcttcacgtt 480  
agaaagatca aaccgcctag tttggtccat gtggtgtaac agtcgtccgg gtgtacaaat 540  
gagaatgttc agcttggcca gtcggtcagc ctccatggca acgtccttcc ctccaataac 600  
caaaccagca gagaagctgt gacaacggcc gattttctgc agaacctgga aaatctggac 660  
cgccagttct cgagtcggac taataaccag ggctcctaaa ccatccacat cactccactt 720  
gtttcgaac aggcactcca acacaggcac cagaaacgcc agagtcttac cacttccggt 780  
acgcctgct ccaagcagat cgtggccttg cagagcggga gggatggccc gcttctgaac 840  
atcggtacag gtgacataat gtgaatttt tagaccctca atagtagcct cagacaaggg 900  
cagctcctca aacttggaac cctccttgtc ggctcgtcc tctccaaagt tgtcgaacgc 960  
ctcctgcagc ttggagagct tctgtttgtg ttcctctcgt ttgattttac gaggatcggc 1020  
tcgtttcttc atttctgcca tatctcaagc tgtcggataa atttcttga caaaaaatc 1080  
taactttctg tgcgccttca cttttatcag tctgaaaatt acacatgcat gcagcttggg 1140  
gtatggaggc gacagaggtg catgccagag tgcataaatt agggcaacgg ggggtggaag 1200  
aagggcgcaa aagatgtgac gacggtgcaa gacgacggt tactgcagac aaggtctttc 1260  
actgcaaac tctggttaa atcgtgggtc ccgcgtctcc gtatcatatg actttgggtc 1320  
acgtgactgc aagattttta aggtttcga cccccaaatt gagtcaactg tcgtctctct 1380  
gcaacatgag gtatcgtaaa tttagaatga ctgcacctga caggccatca aggacctga 1440  
tgcaactctg aaattagagg gaggaggtaa tgagaaacag tgctggattg tggtagagaca 1500  
ttgaagcggg attggttaac ctgtttcttt tttgtcgttt gctcttcatt attgagattt 1560  
ttgtagtcat ttgattagat cagatcagca gtccctcat gctgtcgttg atgggcgct 1620  
aatcagtgtg acgctttgaa tgaggatggt gtgagtaata ctggttcat tggggggggg 1680  
ggggggggta ctgttactcg aaaaacaaat catatgcatc tctgaactg ccggggtgtg 1740

ES 2 553 383 T3

gcatgtttct cgcttcgaaa aataaatggt ggctgttcca ggcttgtctc agacctgcaa 1800  
 gaatcatact ggcgtaactc cggccaggtc tggtcaggaa caagagagta aaagaaatgt 1860  
 ttgagtctcg gctttcacat cctcggcact agataagcag caatatcaat gtcacattgc 1920  
 ttgcttgtgc aggtcagggg gaggggatg tatatgatac aagcagggtc gcatctacag 1980  
 aatctacagt atgtatctga tgatagcctt acacagcgca cgcagatgta gtttttgggt 2040  
 tgaacagtgt cagcgggaagc ggcgtagtgg ggtactgtag tacagaatca acggaatgaa 2100  
 gtttacaact gcttctgtta ctgtagcctt tcaactgttca aatgataacg ttggagaaga 2160  
 gtgcaccctc tgttagatag gattacagtc cagacacaca ttggcaccga agtctgtagt 2220  
 caaacattgg tctcagttgg tgtaatgaca ttcaatagac tgattctgca actcctacac 2280  
 cttgcattgt acacccgaga ccccttgtac ggccccgatt tctccttcac atgtcggcat 2340  
 gtgtcttgtc tgtagccact tcaatgggat gcagtattag cactgtcggga cacacctcag 2400  
 tcaatgggaa tggaatgcca tgctcctagc ggctcattgt ttgctaggaa atacagttaa 2460  
 tagcacagat catagagtct aggctctata cgtcttagaa caaccattat ttgtttaaac 2520  
 gacaacttgg taagcgaatt acagtaagta gctattgttt ctatctctgt cagtgttcgg 2580  
 ataagtcctt agatcaccat actcaaagtg gtacgtttcg tcgcatcgga cgagaagtgt 2640  
 gtctatcacc gtttttttt gccgctctca tttttgcggt cggaaataatt actgtggacc 2700  
 ctcggcgccg accgttttgc agggctcctc aacctaaaac ttctccgagt ctgtgccttc 2760  
 aggtgggcat agttgatggg tgttttgaag ttaatagtgg ggaagaacta tggcaaacaa 2820  
 gcagatgcag gcaccttgta actgcagacc ggttcttgtc taccgactcc gctgcacctg 2880  
 tgcccggtta catgtcgtca caggctcggg ggttcggagg cccocttgca acctccttg 2940  
 atagttgcta tggcccaaaa gagttatagc agatagacc acagatctac ttgactgttg 3000  
 tcacagaacc tgctaggttt gcttattgta cccgctttgt agctactgta caacgacaac 3060  
 gtctaaaatt gagacgcgaa caaactccag atgcagaacc caaacctctc tctcagagtt 3120  
 tcgagtgtt ctacctcaca gtaaagtgga ggtggacctg caaggaatt cagtcacaag 3180  
 gccccgaatg tctccgaaac tccaatcgga cggtttaaac agactaatat cacgtcattg 3240  
 attgatatta gcatccggca agagccgcaa ggttatctcc tcaccaatga gcctgttgta 3300  
 cggctcattc cgcactctgc gctgattcag ttctcagtg ggtggtaga cttcattgca 3360  
 gcattcctaa ccttctactt ggtccgtgga gatgtcatgg acatcgattt tgggctgaga 3420  
 agccttttga cgatgtcgat atcaactgacc gctaatttac tctggcagtt tctccgctc 3480  
 tcgaggcatc gtcgatcacc aaacactatc tgctagtcta aatgtccgac acgacagctt 3540

ES 2 553 383 T3

ttgatcgccg tgaacggcgc agacctcatg caccatgcac cagggcctaaa tcaattacgg	3600
gtcgcttagc gttgcagtcg gggcattatg gtggaagttc cgatacggca cagacacatt	3660
ccatagtggg gggattggat tataaaaggg ccatagaaag ccctcaattg ataccaagt	3720
accagctccc ctactatga agctttccac catccttttc acagcctgcg ctaccctggc	3780
tgccgccttc ccttccccca tcactccttc tgaggccgca gttctccaga agcgagtga	3840
cacctctacc gagacctctc acattgacca ggagtcctac aacttctttg agaagtacgc	3900
ccgactcgca aacattggat attgtgttgg tcccgccact aagatcttca agcccttcaa	3960
ctgtggcctg caatgtgcc acttccccaa cgttgagctc atcgaggagt tccacgacct	4020
ccgtctcacc tttgatgttt ctggttacct cgtgtttgat catgcctcca agcagatcta	4080
ccttgttatt cgaggaacct actctctgga ggacgtcata accgacatcc gaatcatgca	4140
ggctcctctg acgaactttg atcttgcctc taacatctct tctactgcta cttgtgatga	4200
ctgtctgtc cacaatggct tcaccagtc ctacaacaac acctacaatc agatcgcccc	4260
caagctcgac tctgtgattg agcagtatcc cgactaccag attgctgtca ccggtcactc	4320
tctcggagga gctgcagccc ttctgttcgg aatcaacctc aaggttaacg gccacgatcc	4380
cctcgttgtt actcttggtc agcccattgt cggtaacgct ggctttgcta actgggtcga	4440
taaactcttc tttggccagg agaacccccg tgtctccaag gtgtccaaag accgaaagct	4500
ctaccgaatc acccaccgag gagatatcgt ccctcaagtg cccttctggg acggttacca	4560
gcactgctct ggtgaggtct ttattgactg gccctgatc caccctctc tctccaacgt	4620
tgtcatgtgc cagggccaga gcaataaaca gtgctctgcc ggtaaacctc tgctccagca	4680
ggccaatgtg attgaaacc atctgcagta ctctctcacc gaggtgtct gtggtatcta	4740
agctatttat cactctttac aacttctacc tcaactatct actttaataa atgaatatcg	4800
tttattctct atgattactg tatatgcgtt cctctaagac aaatcgaac cagcatgcca	4860
tcgaatggca taaaaagtt tcttccgaag ttgatcaatg tcctgatagt caggcagctt	4920
gagaagattg acacaggtgg aggccgtagg gaaccgatca acctgtctac cagcgttacg	4980
aatggcaaat gacgggttca aagccttgaa tccttgcaat ggtgccttgg atactgatgt	5040
cacaaactta agaagcagcc gcttgtctc ttcctcgaac ctctcaaca cagtccagag	5100
gtcctttata gcttgatctg tatccagata gcctccgtaa ttgggtgtgtg tcttcaaatac	5160
ccagacgtcc acattggcat gtctccact gataagcatt tgaagtcat ctgcgttgaa	5220
cattgagacc cacgaaggtt caatgagctg gtatagaccg cccaagaatg catctgtctg	5280
tgttctgata ctggtgtaaa gctt	5304

<210> 6  
 <211> 2092  
 <212> ADN  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

5

<400> 6



ES 2 553 383 T3

acgcgtgtga tcgcgagcga gtaacgtcca ccagtcttct gggagcccct ttcctccaaa 60  
 aggcctgaca ttgacgcttt aaaaaagttg acatctgaaa caagcagccg ttgccggggg 120  
 tctcattggt ataagacagg ataccgttga ttcaccggtc atggttcacg ctagtttgca 180  
 accccccccc cgcagagatg caacctccac ctaaggaata tcaagacaaa agactcaagc 240  
 acaagttgaa gcatggcaca agctccagcc cacatgcca gggtcacagg tggatatatt 300  
 gactggacct acattctttg tctgcgtgac agtttcgaga atgtgaagat acccaaagtg 360  
 cgggtattat gatgctggca gggcctccca gggctctgtt caaatcgcta caaccacatg 420  
 gctggattat ctactcattg cagatcagga acactttctg ttggctcccg cgtgcagata 480  
 ttatcatcta actagtagct aaagtcgctg tagcgcctct ctagcacagt catgcacggt 540  
 tagatctggt cgggtcatgt caggtatacc tgtttattgg tatattgagg ggattaccag 600  
 ttgaacaagc atgacggctg tggcggtaga tacacaaaga gaacgacttc tataagaggg 660  
 actattcttg ccctctgggt catcatcaag cagcagcttt ccacccttct ctctcccaat 720  
 ggtatccctc tctgctcgaa tcaaagactt tttttcggtc ctctcctcg gagctgcaac 780  
 catcactccc tccacacaga ccgcagcgtg gtctcaaggg ttctatgatt ttgctcggga 840  
 ctttgcccat ctgtccaaca ttgcctactg tgtcaatgct cccatcactc cactgaacco 900  
 ggacttcacc tgtggcaact cgtgcaagca ctttccggaa attgagcttg tgaagacatt 960  
 tggaggcaac ttcttcaaga cctccattac gggctacctg gctgtcgatc atgtcaagaa 1020  
 ggagaagtac gttgtcttcc gaggaacctt ttccgctggca gacgcgatca cggacatgca 1080  
 gttccagctg tctcctttcc tggtcgatgt gcctgccttg aacactttct cagctaatga 1140  
 caccaccgca gaggcccaga cgcactgtga gggctgcaaa attcacgacg gcttctccaa 1200  
 ggcttttacc gagacctggg gtaacattgg tgaggatctg cagaaacacc tggacgctaa 1260  
 cccggactac cagctgtagc tgactggcca ttctctggga gctgctatgg cccttcttgg 1320  
 agctacttcc atcaagctca agggctacga tcccattctc atcaactacg gacagccccg 1380  
 agtcggaaac aagcccttcg ctgagttcat taacaagttg tggtttgag aaggcaacgg 1440  
 tctggaaatc acccccgaga gaaagctgta ccgaatgacc cactggaacg acatcttgt 1500  
 tggcctgccc aactgggagg gatacaccca ctctaacggt gaagtataca tcaacaaccg 1560  
 gttcatcaac cctcctctca aggatgtcat ctcttgtgct ggaggcgaaa actcgaagtg 1620  
 ctaccgatcc tcgttcagcc tgctgcecca gatcaatctg ctccaaaacc acctggctta 1680  
 cattgattac attggatact gcgctctgaa cattggctga cgagagcttg ccgatcagga 1740  
 acattacact ggtccttatt actatggtca tcgatctgag gaggacttta agaagttggg 1800  
 cttggagcta tccaccccac aagttgagaa ctgaacgagt tgacatgcct gcactactca 1860  
 acaactaact acttgtagtc gtcactttac tattatctag ctgtaattgt atattaatat 1920  
 atctaacgaa tataacagac ggctatagag tacaaccttc atcatacaac tcatgactga 1980  
 gttcatttcc cgactaatga gactgacaaa tgttgggctt ggagggttgt tgggcttggg 2040  
 ggactgttgg gattggagga ctgttgggct cgaagaggtt gatgtgtttt ct 2092

ES 2 553 383 T3

<211> 3478  
 <212> ADN  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

5 <400> 7

tcctcgtcat aatgacgata aaatztatgc tatggtataa aatcactggt ttacgtcagc	60
gctgccacgc acaggtattc acatgtagct atgacaaacc acacggcata tgaacatgcg	120
ataaggcaac aggaacattt ttttcagttg ttccctctcga atagggtcac tttatgctag	180
gcttgtaacta ttaacaactc ggcacctgca caagtctgaa ccccgacttg caacgaattg	240
tggggtgcca gagggactac tacaggtaca acctgaacag taaaagaggt agttgagcag	300
gcaacataac gtgatatcaa ccaggccaca ttagagaccc caagctgcgg gtgatctcta	360
taggtgtcct tcgatatcac tcatcacttt tttggagtgt tggtcgaaag ggatgcacca	420
ccggttaaga gtacctggtg aatTTTTccc gaggctgaca ttccctagatc agagttgtgt	480
ctcattgata agagaagtga actacttgta gcagtgacag ttccctatac tgcttttcca	540
actgtacgag ggcacacacg gcctccgaag aagcaaaagt gaacgccgaa gaagctcatt	600
cgaggctatc agtgttctaa agatggtgat ctccctgtgc caatatgaac ggcaccagct	660
ggttaatgtg gggttgagag tgcggaacct tgttcgaagg ccattctac tctgtacacg	720
atgtgcaacg gccagcgaga tatcaatgag tacggcgtgt atatgtctca gggagaaaaa	780
aactccttcg gggtagcgaa cctcaaacac cactgagctc ctaacggctc tagaggagag	840
tcctcttgag cgattgagtc actgaggagc agggttccat caagtcgcag ataaagaaac	900
aagcaaacia cgatgccgtg tatctcacac ccacctcaa gacccttggg agaccagcca	960
tgaaccttag cttccaccaa agcctgaacg gcacgagcgc atcgtggcaa tccacgtgca	1020
agtgtaaatc agtgtttaat ctccaagcct gcatggttta gcagggggcc gtcctatagt	1080
aactgcacga tagcgcctg ccaagcgatg ccacgacggt gccagaaac atggaatgtc	1140
ctagttttgg agtgggtcgt tgcggattat gttagcgtg tgtgttactg ggggaataga	1200

ES 2 553 383 T3

gatacgcctcc ctgcgagctc agacgtcaag tgcacccata tactcggctc agaccattt 1260  
 ctgcctcttg tccaaagttt gaccctggct aaggcacatc agggcctatc gtgataaaca 1320  
 agtactgtac atctgtatgt acgtgggggt actgcgaaaa ctgataacgt tgaaatacaa 1380  
 tggcttgaaa tcggtgtcgg tctgagtga ttctagcgtat tgtacggcaa gatatatatt 1440  
 ggagtctctc aataacatat tgcttttgga tcaatggttt tgttggttc tgctggacca 1500  
 aatacacgtc ccttgggtgag acaaacaaac acaccacgcc gttatcgccc accttatttg 1560  
 ccttctaata ccgcactata ttggaacttt cgactcattg accatgcac tcaccagagg 1620  
 caatgactga ggaccaggtc gaagtagctg gcggaaaagt ggttgtagca gaaaacagat 1680  
 tcacaagtac ctataaatca ctttgtgtgt gaggactctg gaactgctca cgagtggttc 1740  
 caggctactg gtagtctctat tcgagctcca aagcacatta agttacgctt ggtgaactat 1800  
 agcttctggt cctctgcttg caatgaagct gtgggtggag taaacgggtc cgcttaatac 1860  
 agggatggtg cgtgagatag gagatttga gccgtctact ctgtcggcca acgacataaa 1920  
 tagacccctc cagtcacctt agacacagca gaattccacc agatcagctt ccaattctaa 1980  
 agatgcagtt ctctcttgcc acccttacca ccctcttggc ctctcgttgc gcagcccccg 2040  
 caaacaaggg atttgttcat gccctatca agaagcagtc cctccaggcg gccagagca 2100  
 agatcccaa ctttgcctcc tccggcccca tcaactgccga gctctacaat gagctcatgg 2160  
 cttaccaggt tcaaatttct cttggtggtc agactatctc tgccagcatc gataccggat 2220  
 ccgagattct gtgggtttgg gagaacgact ctattgcttg ccaggttgac cagcaggact 2280  
 gcgacactga cggctcttac aacccaaga agagttccac gagcaaggac accggagtgc 2340  
 ctttcaacat caactatggc aaggacatg ctgatggtta cctctacact gataatgctg 2400  
 tcattggtgg agcttccgct cctggtttca agtttgggtg caactctggt gatctcagct 2460  
 ccggcggctt ctccatggtc ttcggtatcg gtgtgaacag cgacgcctct acttccatct 2520  
 ctgctcagct ccaaagtcc ggcgagatct cccgaaacct ttacggtatg tcattcagcg 2580  
 acgccaacct tgctggcacc agcaacgaca actctgagat caccttgggt gctatcaaca 2640  
 ctggctgata cactggctcg cttaagacca ttccccgagt tgcgaccaa ggcggatacc 2700  
 agcacttttc cgtttctgcc tccggaaagt ttggagatgt cgacctctc gacaatgacc 2760  
 tcgtcattct agactctgga accaccatga cttacctcaa gtcggactac tacaacgcct 2820  
 tcctcggcgg cctcaggaggac cttgatatca ccctcagtga ctactctgga ggatggcacg 2880  
 gatacccttg ctctgaaaac tcgaagatca acttactta caacttcagc ggtaaggaaa 2940  
 tcaactgtgac tggacacgac ctggccattc ccggcaacgc tgtcaactcc aatggtgact 3000

ES 2 553 383 T3

cctcagtgtg tttcatgggt gttgacgatg gtggaaacat gaacctgttc ggtgacacct 3060  
 tcctgcgagc cattieactcc gtctacgatc tcgagcgaga tgaggtctct attgcccagg 3120  
 ctgcccattg caagcccagc aactacgtgg tcatcactgg tgatgtcccc aactagacta 3180  
 ttattatcta gcattttctc tacaagaagc cttatggcaa ctatataatt taattcatta 3240  
 aaaatgttct atgctaaatg gtgaggcagt gattcaattg cagggtcaac attgttggat 3300  
 gcaattcaag ttttcaatgc gcgcggtggt gtattcggcc cagaggaggc ccaaagacga 3360  
 gtggaacatg atcgccaggc ggagcctttg gactgaaata atcaaagagc tcattcaatt 3420  
 ggtttttagt ctgctcaaac tccttttgaa cgggtctcaag ctgcttctcc accccaca 3478

<210> 8

<211> 2966

5 <212> ADN

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 8

gttcgtgccg agctcttgtt ctaccgattc agacgtacgg tcgagcttat tgaccgaaag 60  
 aacgaggaca gacgcaactc agcggacggc tccgagcctg tttccatcac agaggacctg 120  
 cgggaattgt tatctcggaa agtcattggt gtgctgagg gtgagcgtcc tgaaggcgta 180  
 atgggtgggt aggtaatgca gtttgcattc atgaagacac taaacaagcc aaccatacag 240  
 cagaagtatg tagccttgca catgatttat tgacaggcca cccaacagg cgatgtata 300  
 gtactgtacc ttcagtagac tattgtagct aacatgtcgt tgcgtggcgt atgtaccaag 360  
 ccacagaaat tatgtcagag ataaggctgc gacagttaga gcagcaacgc gtggagagtt 420  
 tgggttttgg gttacgtacg tagagccgtt tgatagatgg tacatccacc ggctagcgga 480  
 acacagtgtc aagacaagcc tgcaacacag tcaataatatt tgcgatattc aggcgatca 540  
 ggtacaatct gaggtgtctc acaagtgcg tgcagtcocg cccccaettg ettctctttg 600  
 tgtgtagtgt acgtacatta tcgagaccgt tgttcccgcc cacctcgatc cggggtccta 660  
 tgcacccctg aaacattgat tggaaattaa catatgagct gcgtgctttt tgcattcaag 720  
 ggcgcagctt atcttgtatc ctttaattaca catgacctct tgagcgccac ggtacattcc 780  
 tggcgtcagt tcggtggagc ggacactttt ctctcctttg tctgacatgt tggttaagtt 840  
 gtagtccagg gacacaaggg gttccaacgg cagtggcagc ctaccccacg ctaccacca 900  
 ctggccctgg tctaacttcg acgatcggca tcagggttca tggataggtg gtgtgattta 960  
 cgatgtgatg gacaatgtta gagagatccc actacttcta gtcaggccat cttttacgta 1020  
 cgcactgtac catgatgtca atggagtatg atgaaccgac tttgagagac tcacatctgc 1080  
 10 acaacaccat gtttcagcgg aatccgactt ccaacccaaa cccaagcccc tgtcagatat 1140

ES 2 553 383 T3

cgtgagaagg cacggcacca actaatgcac aactccacc tgtattgcac caagataatg 1200  
 agggcatcgt cttggcgcgt cttggcgaga gccgtgttc gtgacgcaat cagagcagtt 1260  
 tctggatagt atcttgtcca gaaacacgat ataaacccca tcgacgggcc cgttgaagag 1320  
 caccaaccca ctatccaatc ctccaatcca acaatgaagc tcgctaccgc ctttactatt 1380  
 ctcaactgcc ttctggccgc tcccctggcc gccctgccc ctgctcctga tgctgcccct 1440  
 gctgctgtgc ctgagggccc tgccgcgct gctactcat ctattctgtc cgtggctcgt 1500  
 aagcagtcca agaagttaa gcaccacaag cgagatcttg atgagaagga tcagttcatc 1560  
 gttgtcttg acagtagcgc tactgttgac cagatcgct ccgaaatcca gaagctggac 1620  
 tctctggtcg acgaggactc gtccaacggt atcacctctg ctcttgatct tcctgtctac 1680  
 acggatggat ctggctttct cggatttgtt ggaaagtca actccactat cgttgacaag 1740  
 ctcaaggagt cgtctgttct gacggctgag cccgatacca ttgtgtctct ccccgagatt 1800  
 cctgcttctt ctaatgcaa gcgagctatc cagactactc ccgtcactca atggggcctg 1860  
 tctagaatct ctcataagaa ggcccagact ggaaactacg cctacgttcg agagacagtt 1920  
 ggcaagcacc ccaccgttc ttacgttgtt gactctggta tccgaaccac ccaactccgag 1980  
 ttcggaggcc gagctgtctg gggagccaac ttcgctgaca cacagaacgc tgatcttctc 2040  
 ggtcacggca ctcacgttgc aggtaccgtg ggaggaaaaga catacggagt cgacgccaac 2100  
 accaagctgg tggccgtcaa ggtgtttgca ggcgatccg cagctctctc cgtcatcaac 2160  
 cagggcttca cctgggctct caacgactac atctccaagc gagacactct gcctcgagga 2220  
 gtgtgaact tctctggagg aggaccaag tccgctccc aggacgccct atggtctcga 2280  
 gctaccocagg agggctctgct tgtcgcctc gctgcgggaa acgatgccgt ggacgccctgt 2340  
 aacgactctc ccggtaatat tggagctcc acctctggtt tcatcactgt gggttccatt 2400  
 gactctagcg ataagatctc cgtctggtcc ggtggacagg gatccaacta cggaacttgt 2460  
 gttgatgtct ttgcccccg ctccgatatc atctctgctt cttaccagtc cgactctggt 2520  
 actttggtct actccggtac ctccatggcc tgtccccacg ttgcccgtct tgccctctac 2580  
 tacctgtcca tcaatgacga ggttctcacc cctgcccagg tcgaggctct tattactgag 2640  
 tccaacaccg gtgttcttcc caccaccaac ctcaagggt ctccaacgc tgttgcctac 2700  
 aacggtgttg gcatttaggc aattaacaga tagtttgccg gtgataattc tcttaacctc 2760  
 ccacactcct ttgacataac gatttatgta acgaaactga aatttgacca gatattgttg 2820  
 taaatagaaa atctggcttg taggtggcaa aatgcggcgt ctttgttcat caattccctc 2880  
 tgtgactact cgtcatccct ttatgttcga ctgctgtatt tcttattttc catacatatg 2940  
 caagtgagat gcccggttcc gaattc 2966

<210> 9

<211> 173

5 <212> PRT

<213> *Erwinia chrysanthemi*

<400> 9

ES 2 553 383 T3

Met Thr Glu Pro Ile Phe Met Val Gly Ala Arg Gly Cys Gly Lys Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Gly Arg Glu Leu Ala Arg Ala Leu Gly Tyr Glu Phe Val Asp  
 20 25 30

Thr Asp Ile Phe Met Gln His Thr Ser Gly Met Thr Val Ala Asp Val  
 35 40 45

Val Ala Ala Glu Gly Trp Pro Gly Phe Arg Arg Arg Glu Ser Glu Ala  
 50 55 60

Leu Gln Ala Val Ala Thr Pro Asn Arg Val Val Ala Thr Gly Gly Gly  
 65 70 75 80

Met Val Leu Leu Glu Gln Asn Arg Gln Phe Met Arg Ala His Gly Thr  
 85 90 95

Val Val Tyr Leu Phe Ala Pro Ala Glu Glu Leu Ala Leu Arg Leu Gln  
 100 105 110

Ala Ser Pro Gln Ala His Gln Arg Pro Thr Leu Thr Gly Arg Pro Ile  
 115 120 125

Ala Glu Glu Met Glu Ala Val Leu Arg Glu Arg Glu Ala Leu Tyr Gln  
 130 135 140

Asp Val Ala His Tyr Val Val Asp Ala Thr Gln Pro Pro Ala Ala Ile  
 145 150 155 160

Val Cys Glu Leu Met Gln Thr Met Arg Leu Pro Ala Ala  
 165 170

<210> 10  
 <211> 348  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

<400> 10

Met Glu Phe Phe Lys Lys Thr Ala Leu Ala Ala Leu Val Met Gly Phe



ES 2 553 383 T3

Gly Tyr Asp Gly Ile Val Ser Ala Gly Val Gly Asn Gly Asn Leu Tyr  
 260 265 270

Lys Ser Val Phe Asp Thr Leu Ala Thr Ala Ala Lys Thr Gly Thr Ala  
 275 280 285

Val Val Arg Ser Ser Arg Val Pro Thr Gly Ala Thr Thr Gln Asp Ala  
 290 295 300

Glu Val Asp Asp Ala Lys Tyr Gly Phe Val Ala Ser Gly Thr Leu Asn  
 305 310 315 320

Pro Gln Lys Ala Arg Val Leu Leu Gln Leu Ala Leu Thr Gln Thr Lys  
 325 330 335

Asp Pro Gln Gln Ile Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr  
 340 345

5 <210> 11  
 <211> 109  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Fragmento de PCR

<400> 11  
 tgcagctttc gagaaccgac gcctgggacc tgtgtctgta gggataacag ggtaattcgc 60  
 ttcggataac tctgctata acgaagtat gtagggataa cagggtaat 109

15 <210> 12  
 <211> 98  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Fragmento de PCR

<400> 12  
 tagggataac agggtaatta tcgcttcgga taactcctgc tatacgaagt tatgtaggga 60  
 25 taacagggta attaactata acggtcctaa ggtagcga 98

30 <210> 13  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador PCR

35 <400> 13  
 gatctgctag tgtataagac tctataaaaa gggcc 35

40 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial



	<220>		
	<223>	cebador PCR	
5	<400>	14	
		cttttatag agtcttatac actagca	27
	<210>	15	
10	<211>	31	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador PCR	
	<400>	15	
		ccggaattcc tgaccagtct cacatccgac c	31
20	<210>	16	
	<211>	41	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	cebador PCR	
	<400>	16	
30		ccggaattct aaagcagata ctcaacaact cagcaatagt c	41
	<210>	17	
	<211>	23	
35	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador PCR	
40	<400>	17	
		ggagctaccg gctccggtat cgc	23
45	<210>	18	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
50	<220>		
	<223>	cebador PCR	
	<400>	18	
55		gcgataccgg agccggtagc tcc	23
	<210>	19	
	<211>	31	
	<212>	ADN	
60	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador PCR	
65	<400>	19	

	cggaacgct ggatcttca acatcaaggc c	31
	<210> 20	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> cebador PCR	
	<400> 20	
	ggccttgatg ttgaaagatc cagcgttcc g	31
15	<210> 21	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 21	
25	ggagcaggag ttcaacaccg gtgtcg	26
	<210> 22	
	<211> 26	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
35	<400> 22	
	cgacaccggt gttgaactcc tgctcc	26
40	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador PCR	
	<400> 23	
50	gcagatccac tgtaagccg	20
	<210> 24	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 24	
60	gctagggata aacagggtaa tgcgtagga aagagaagtt ccgcg	45
	<210> 25	
65	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

	<220>	
	<223> cebador PCR	
5	<400> 25	
	gcattaccct gttatcccta gccggactat ttccccgcag c	41
10	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 26	
20	gcagccagca gcacgtagta g	21
25	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 27	
35	gaatgacggg ggcaacgcag	20
40	<210> 28	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 28	
50	cagcagccac aaatagcaga ctgcc	25
55	<210> 29	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 29	
65	ccggaattcc gtgacaacgg atgatgctgt cacatgacg	39
	<210> 30	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
70	<220>	
	<223> cebador PCR	
75	<400> 30	

ES 2 553 383 T3

	ccggaattcc tgttgcatg cacagctcca ctcaacg	37
	<210> 31	
	<211> 32	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
10	<400> 31	
	tcccgctagc cgaggtatgc aaggacgagt gc	32
15	<210> 32	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 32	
25	ataagaatgc ggccgcgca gctgagagcc gataccaagg gatgcgag	48
	<210> 33	
	<211> 48	
	<212> ADN	
30	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
35	<400> 33	
	cattaccctg ttatccctac agacacaggt cccaggcgtc ggttctcg	48
	<210> 34	
40	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador PCR	
	<400> 34	
	ctagggátaa cagggtaatt aactataacg gtcctaaggt agcgacctcg gaaaccactc	60
	tgccagtcac cgggtgc	77
50	<210> 35	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 35	
60	atagtttagc ggccgcggaa gcgtgtcaac gacatgtcc ctctcatac c	51
	<210> 36	
	<211> 35	

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador PCR  
  
 <400> 36  
  
 10 cgacgataga gcaggtctca ctgtgggaa tgctg 35  
 <210> 37  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 15 <220>  
  
 <223> cebador PCR  
  
 <400> 37  
 20 ctacactgac gaagtgaca tcccgcttg gactg 35  
 <210> 38  
 <211> 41  
 25 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 30 <400> 38  
  
 cgcgaattcg cctgctgaa agaagtgagt ggtatgctcg g 41  
 35 <210> 39  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador PCR  
  
 <400> 39  
 45 cgcgaattcc attgccacga cctgttaaaa gacaagatga cc 42  
 <210> 40  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 50 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 55 <400> 40  
  
 gctggccatc cgaatcctgg ctgcttacga cgcc 34  
 60 <210> 41  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> cebador PCR

ES 2 553 383 T3

	<400> 41	
	ggcgtcgtaa gcagccagga ttcggatggc cagc	34
5	<210> 42 <211> 43 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 42	
15	ataagaatgc ggccgctgg tacgttctgt cgcacggac gag	43
	<210> 43 <211> 48 <212> ADN	
20	<213> secuencia artificial	
	<220> <223> cebador PCR	
25	<400> 43	
	cattaccctg ttatccctag agagctggta ctgggtatc aattgagg	48
30	<210> 44 <211> 71 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 44	
	ctagggataa cagggttaatt aactataacg gtcctaaggt agcgacctga tccaccctcc	60
40	tctctccaac g	71
	<210> 45 <211> 44 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 45	
50	atagtttagc ggccgctgg acacaaggaa gtatgcggtc gtcg	44
	<210> 46 <211> 34 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador PCR	
60	<400> 46	
	ctctgtcagt gtcggataa gtccttagat cacc	34

# ES 2 553 383 T3

<210> 47  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 <400> 47  
 10 cctcactct gtcacagatg atgcattcaa cac 33  
 <210> 48  
 <211> 47  
 15 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 20 <400> 48  
 ataagaatgc ggccgcgaca ctactctggc tacagcttgc ggtactg 47  
 25 <210> 49  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador PCR  
 <400> 49  
 35 cattaccctg ttatccctag ctccaataac attcacaggc ttggtg 46  
 <210> 50  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 40 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador PCR  
 45 <400> 50  
 ctagggataa cagggtaatt aactataacg gtcctaaggt agcgaggtgt gttttagtg 60  
 gaggacagtg gtacg 75  
 <210> 51  
 50 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador PCR  
 <400> 51  
 60 atagtttagc ggccgctac tgaaccgact ttggtgcttg cactc 45  
 <210> 52  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

ES 2 553 383 T3

<220>  
 <223> cebador PCR  
 5 <400> 52  
 ctccacgcta atgccatca tactctgttt ggc 33  
 <210> 53  
 10 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> cebador PCR  
 <400> 53  
 20 cctggcgfta caaagccgag ggagacagcc ttgac 35  
 <210> 54  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador PCR  
 <400> 54  
 30 ataagaatgc ggccgcggtg aactgcact attggttgc ttctgatg 48  
 <210> 55  
 <211> 49  
 35 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador PCR  
 <400> 55  
 cattaccctg ttatccctag tcgagctcg taggaggga ttttgggtg 49  
 45 <210> 56  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador PCR  
 <400> 56  
 ctagggataa cagggtaatt aactataacg gtccctaaggt agcgatacgg agatgctggg 60  
 55 tacaagtagc 70  
 <210> 57  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 60 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador PCR



	<400> 57	
	atagttagc ggccgcctat gctacgagcg tcggattcac cacag	45
5	<210> 58 <211> 34 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 58	
15	ggcacactgc tcactatcgc aggctgcaac aatg	34
	<210> 59 <211> 36 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador PCR	
25	<400> 59	
	cctgactcgt ctgatactc aagacctcat tgacgc	36
30	<210> 60 <211> 31 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 60	
40	ggccgctaac tataacggtc ctaaggtagc g	31
	<210> 61 <211> 38 <212> ADN <213> artificial sequence	
45	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 61	
50	ccgaatcgat tcgctacctt aggaccgta tagttagc	38
	<210> 62 <211> 39 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador PCR	
60	<400> 62	
	aatcgattcg gatcccacaa tgaagctcc ccgcggtac	39
65	<210> 63 <211> 32	

# ES 2 553 383 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador PCR	
	<400> 63	
10	ctaggtaccg cggggaagct tcattgtggg at	32
	<210> 64	
	<211> 72	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 64	
20	tatcaaatgc ggccgcttcg ctácccttagg accggtatag ttaacacgat tcgatttgtc	60
	ttagaggaac gc	72
	<210> 65	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
30	<400> 65	
	gagtaatgct cgagtatcga agtctgtac c	31
35	<210> 66	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 66	
45	gcgatattac cctgttatcc ctagaatcga ttcccacaag acgaacaagt g	51
	<210> 67	
	<211> 51	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
55	<400> 67	
	cactgttgc tcttgggga atcgattcta gggataacag ggtaatatcg c	51
	<210> 68	
60	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	

	<223> cebador PCR	
	<400> 68	
5	cgcggatccc acaatgaagc ttccacat cctttcaca gctcgcgcta c	51
	<210> 69	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
15	<400> 69	
	tcgcttctgg agaactgagg cctc	24
	<210> 70	
20	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador PCR	
	<400> 70	
	gaggccgcag ttctgcagaa gcgagccgac aagctgccca acattgat tc	52
30	<210> 71	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 71	
40	ccacctaggc tagtagtgt ggaagtactc ctggatg	37
	<210> 72	
	<211> 18	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador PCR	
50	<400> 72	
	tactcttgt cagcccat	18
55	<210> 73	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador PCR	
	<400> 73	
65	agaagggcac ttgagga	18

## ES 2 553 383 T3

5	<210> 74 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> amorcé PCR	
	<400> 74	
10	tattgccgag cgaatgc	17
	<210> 75 <211> 19 <212> ADN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 75	
20	cttggagatc cacatctgc	19
	<210> 76 <211> 18 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 76	
30	gctgaacgac cgaattgg	18
	<210> 77 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 77	
40	gtggtgtgca gcttgc	17
	<210> 74 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador PCR	
	<400> 77	

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de integración localizada de por lo menos tres copias de un gen de interés en el genoma de una cepa de *Yarrowia* que comprende las etapas de:
- 5
- a) puesta en cultivo de una cepa de *Yarrowia* que comprende por lo menos tres delecciones seleccionadas de entre Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas delecciones a una auxotrofia para dicha cepa, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes;
- 10
- b) transformación de dicha cepa de *Yarrowia* auxótrofa con por lo menos tres vectores recombinantes que comprenden unos marcadores de selección que permiten, para dicha cepa de *Yarrowia*, la complementación de la auxotrofia resultante de cada una de dichas delecciones, comprendiendo dichos vectores recombinantes cada uno:
- 15
- i) la secuencia de dicho gen de interés,
- ii) un marcador de selección, y
- 20
- iii) dos secuencias de ADN que enmarcan la secuencia de dicho gen de interés y dicho marcador de selección, siendo dichas secuencias de ADN homólogas a las secuencias que corresponden a los extremos del sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* de manera que se permita la integración localizada de dicho vector recombinante por recombinación homóloga;
- 25
- selección sobre un medio mínimo, de las levaduras que han integrado dichos por lo menos tres vectores recombinantes.
2. Procedimiento de integración localizada según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha cepa comprende además una delección de un gen asociado a un carácter dominante seleccionado de entre el gen de resistencia a la higromicina HPH (HYG), y los genes MDR3, KanMX, y Tn5ble, siendo el gen HYG el más preferido.
- 30
3. Procedimiento de integración localizada según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que en la etapa b), el sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa de *Yarrowia* se selecciona de entre los genes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 y XPR2.
- 35
4. Procedimiento de integración localizada según la reivindicación 3, caracterizado por que en la etapa b), el sitio de integración localizado en el genoma de dicha cepa *Yarrowia* se selecciona de entre los genes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP8 y AXP.
- 40
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que las etapas b) de transformación de la cepa de *Yarrowia* y c) de selección sobre el medio mínimo se efectúan separadamente para cada uno de dichos por lo menos tres vectores recombinantes.
- 45
6. Procedimiento de integración localizada según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la etapa b), las transformaciones con por lo menos los tres vectores recombinantes se realizan de manera independiente y sucesivamente con cada uno de los vectores recombinantes, o simultáneamente con el conjunto de dichos vectores recombinantes, y por que el conjunto de estas transformaciones está seguido de una etapa c) de selección sobre un medio mínimo de las levaduras que han integrado el conjunto de dichos vectores recombinantes.
- 50
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicha cepa es una cepa de *Yarrowia lipolytica*.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicha cepa de *Yarrowia* comprende cuatro genes que presentan independientemente el uno del otro una delección asociada a un fenotipo de auxotrofia o de carácter dominante, seleccionados preferentemente de entre los genes URA3, LEU2, GUT2 y ADE2.
- 55
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la etapa b) de transformación se efectúa con tres a diez vectores recombinantes.
- 60
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el marcador de selección está enmarcado por unas secuencias que permiten su escisión después de la integración localizada de dicho vector recombinante.
- 65
11. Procedimiento de producción de un polipéptido codificado por un gen de interés, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- d) cultivar la cepa de *Yarrowia* modificada obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un medio de cultivo líquido que comprende unas fuentes asimilables de carbono, de nitrógeno y de sales inorgánicas, de manera que se permita el crecimiento de dicha cepa transformada de *Yarrowia*; y
- 5 e) recuperar dicho polipéptido de interés expresado a partir de las células *Yarrowia* o el medio de cultivo obtenido en la etapa d).
12. Procedimiento de obtención de una cepa modificada de *Yarrowia*, caracterizado por que comprende una etapa en la que se transforma dicha cepa de *Yarrowia* con por lo menos tres vectores que permiten llegar a una cepa de *Yarrowia* que comprende por lo menos tres deleciones seleccionadas de entre Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones a una auxotrofia o a un carácter dominante para dicha cepa, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes.
- 10
13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que dicha cepa comprende además por lo menos un gen asociado a un fenotipo de carácter dominante seleccionado de entre el gen de resistencia a la higromicina HPH (HYG), y los genes MDR3, KanMX, y Tn5ble, siendo el gen HYG el más preferido.
- 15
14. Cepa de *Yarrowia* auxótrofa susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 12 y 13, comprendiendo dicha cepa por lo menos tres deleciones seleccionadas de entre Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 y Ade2-844, correspondiendo el fenotipo asociado a cada una de estas deleciones a una auxotrofia o a un carácter dominante para dicha cepa, independientemente el uno del otro de estos por lo menos tres genes.
- 20
15. Cepa de *Yarrowia* según la reivindicación 14, caracterizada por que se selecciona de entre el grupo que consiste en la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo los números CNCM 1-3911 y CNCM I-3912 y la cepa de *Yarrowia lipolytica* depositada el 4 de febrero de 2008 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, Francia bajo el número CNCM 1-3913.
- 25
- 30

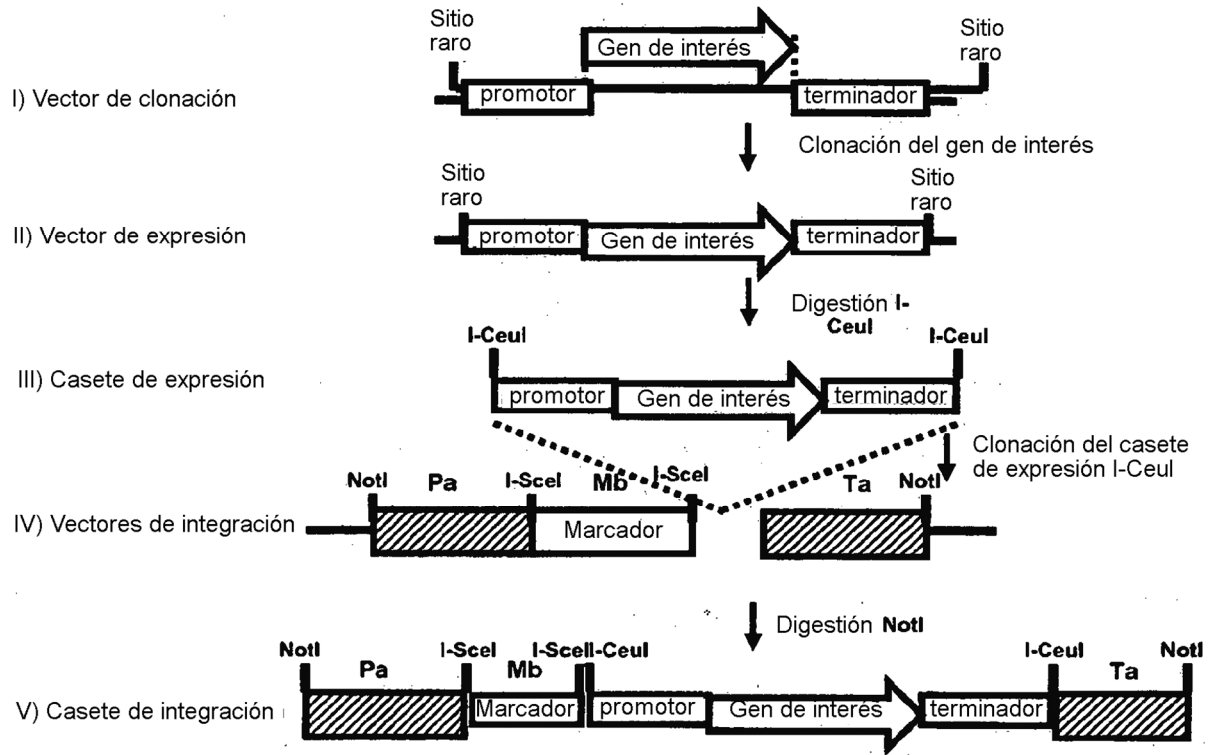


Figura 1

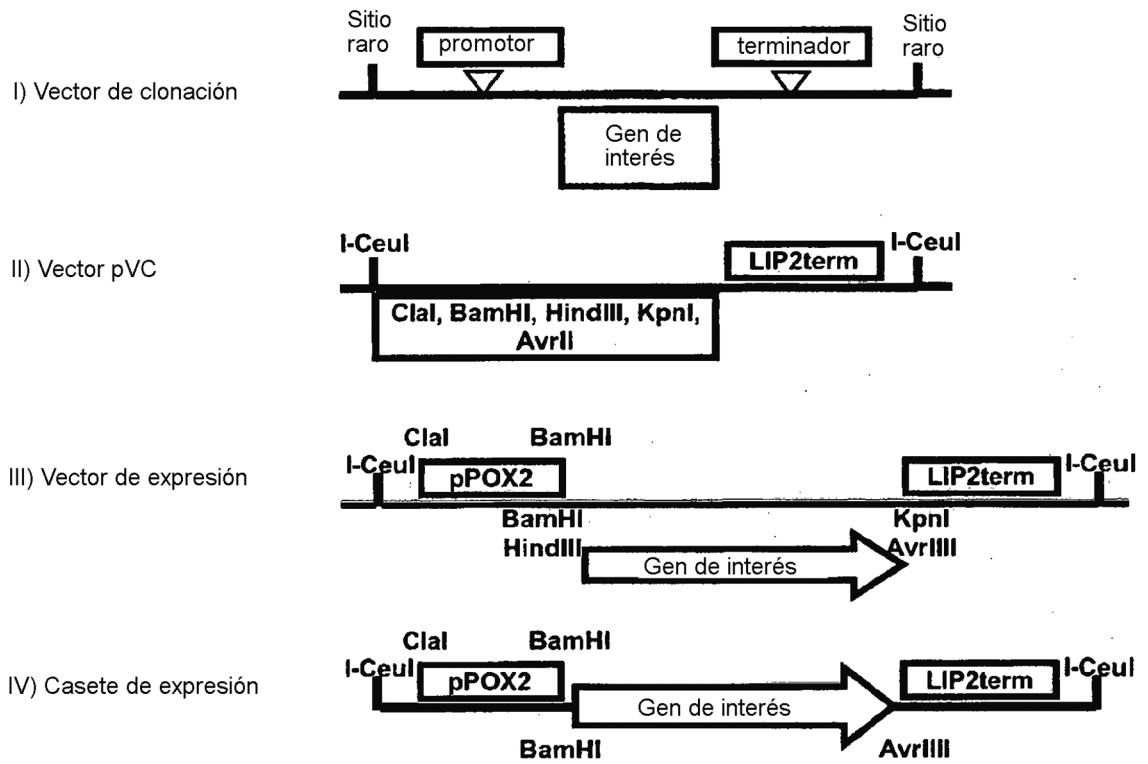


Figura 2



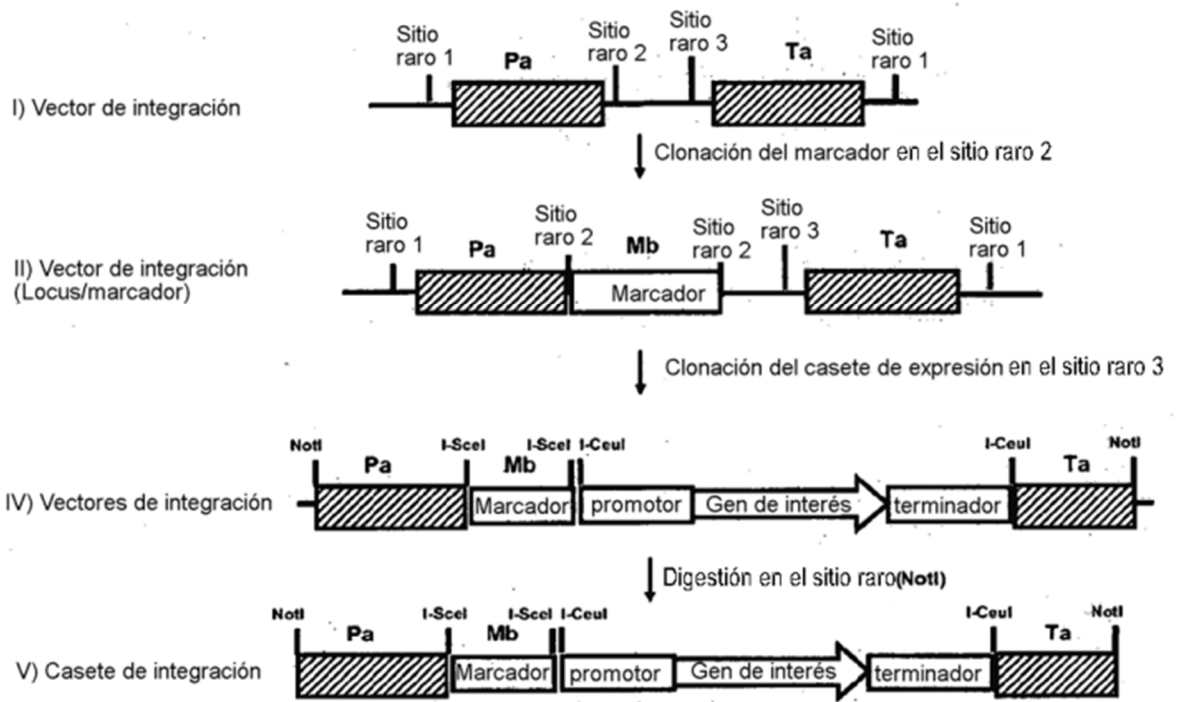
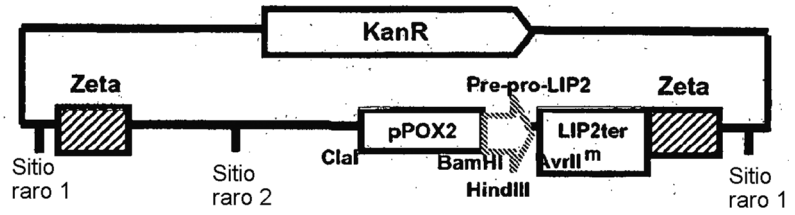


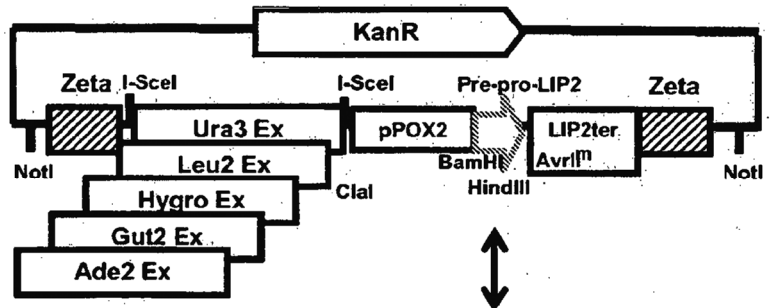
Figura 3

I) Vector de integración



↓ Clonación del marcador de selección en el sitio raro 2

II) Vectores de integración aleatoria con marcador escindible



Con pre-pro-LIP2: serie JMP61-marcador Ex  
Sin pre-pro-LIP2: serie JMP62-marcador Ex

Figura 4

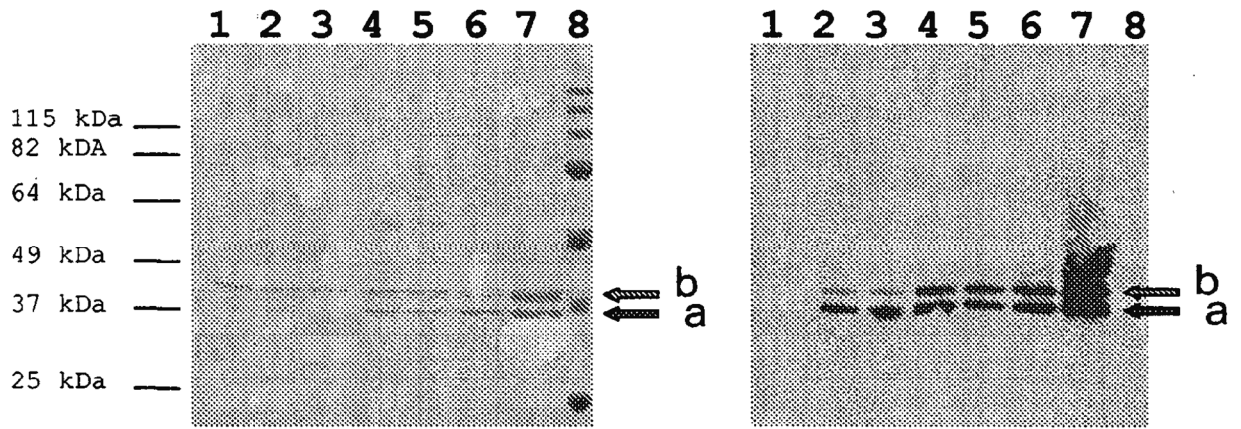
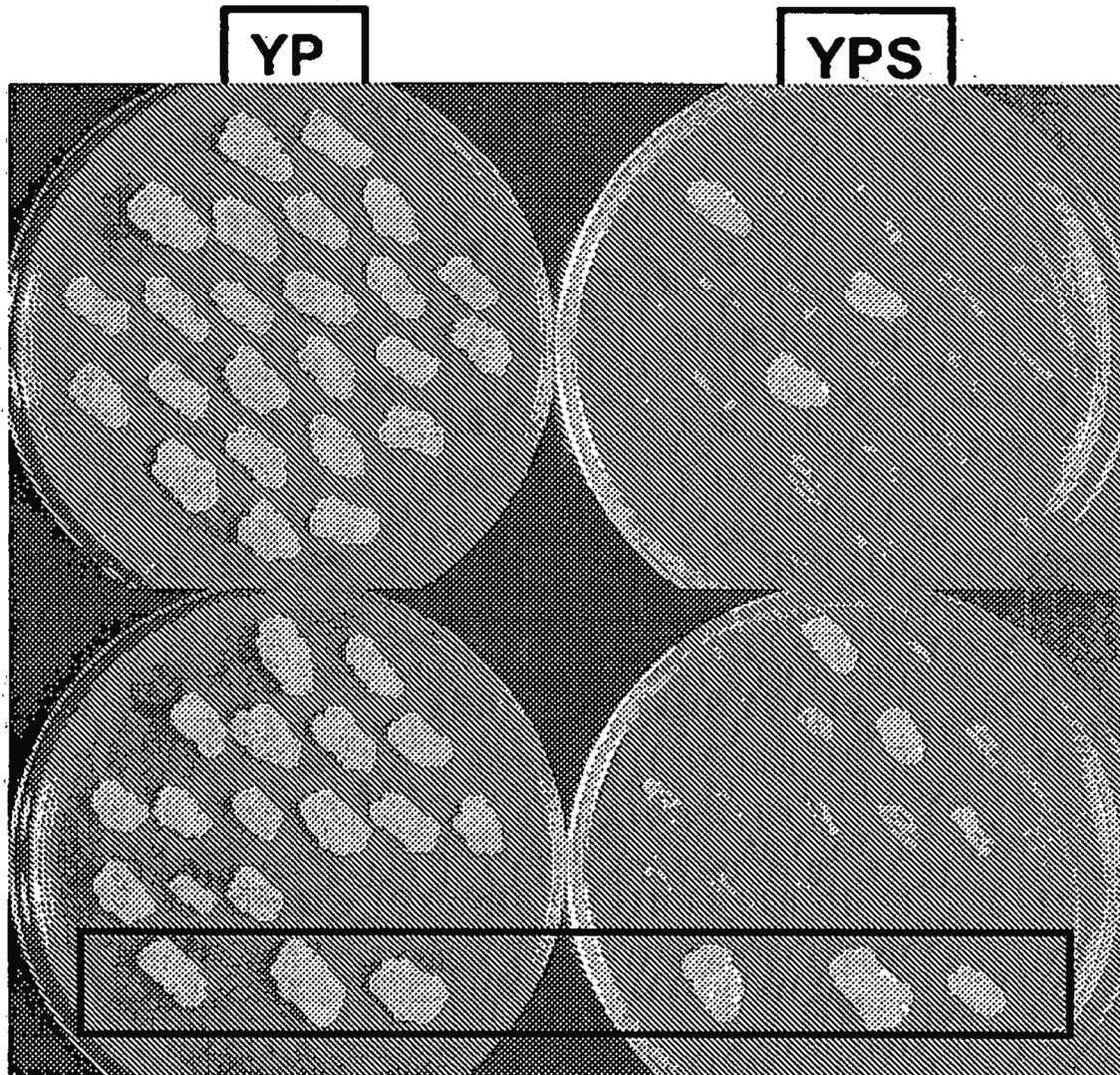


Figura 5



Cepas controles :FF-lug; FF-lua; FF-luga

Figura 6

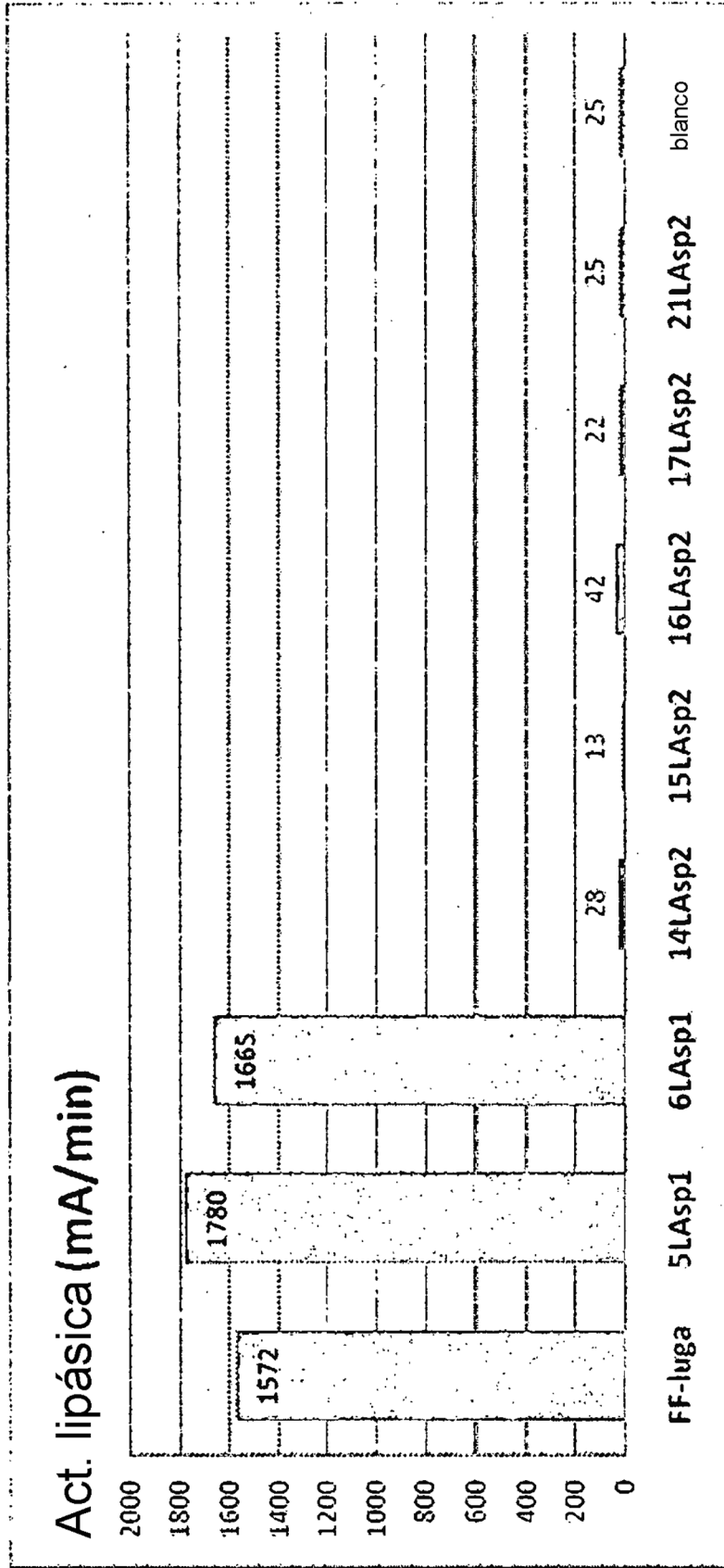


Figura 7

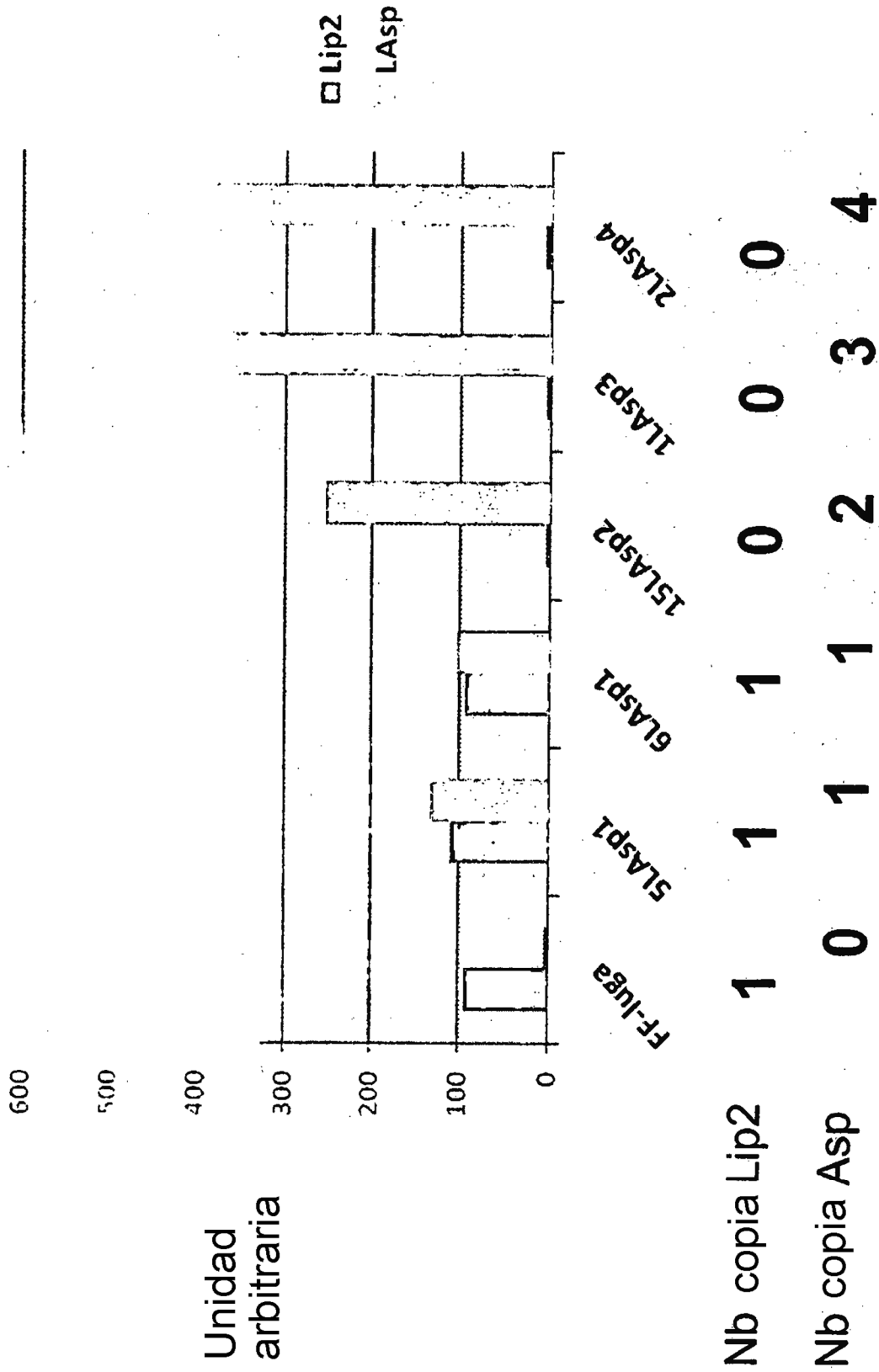


Figura 8