(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 559 312**

(51) Int. CI.:

C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2008 E 08727277 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2129777**

(54) Título: **Multienzimas y su uso en la fabricación de ácidos grasos poliinsaturados**

(30) Prioridad:

03.04.2007 US 909790 P
12.02.2008 US 27898

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2016

(73) Titular/es:

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY (100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US

(72) Inventor/es:

DAMUDE, HOWARD G.;
KINNEY, ANTHONY J.;
RIPP, KEVIN G. y
ZHU, QUINN QUN

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Multienzimas y su uso en la fabricación de ácidos grasos poliinsaturados

Campo de la invención

Esta invención está en el campo de la biotecnología. Más específicamente, esta invención se refiere a multienzimas que codifican secuencias de polinucleótidos y su uso en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA).

Antecedentes de la invención

La importancia de los PUFA es indiscutible. Por ejemplo, ciertos PUFA son importantes componentes biológicos de las células sanas y son reconocidos como: ácidos grasos "esenciales" que no pueden ser sintetizados de novo en mamíferos y en su lugar se deben obtener ya sea en la dieta o derivados por elongación y desaturación adicionales de ácido linoleico (LA; 18:2 omega-6) o α-linolénico (ALA; 18:3 omega-3); constituyentes de las membranas plasmáticas de las células, en las que se pueden encontrar en formas tales como fosfolípidos o triacilgliceroles; necesaria para el desarrollo adecuado (particularmente en el cerebro infantil en desarrollo) y para la formación y reparación de tejidos; y, precursores de varios eicosanoides biológicamente activos de importancia en mamíferos (por ejemplo, prostaciclinas, eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas). Además, un alto consumo de los PUFA omega-3 de cadena larga produce efectos protectores cardiovasculares (Dyerberg et al., Amer. J. Clin. Nutr. 28: 958-966 (1975); Dyerberg et al., Lancet 2 (8081): 117-119 (1978); Shimokawa, H., World Rev. Nutr. Diet 88: 100-108 (2001); von Schacky et al., World Rev. Nutr. Diet 88: 90-99 (2001)). Otros numerosos estudios documentan beneficios para la salud de amplio alcance conferidos por la administración de los PUFA omega-3 y/u omega-6 contra una variedad de síntomas y enfermedades (por ejemplo, asma, psoriasis, eczema, diabetes y cáncer).

Hoy en día, una variedad de diferentes anfitriones que incluyen plantas, algas, hongos y levaduras están siendo investigados como medios para la producción comercial de PUFA a través de numerosos esfuerzos divergentes. Aun que las capacidades naturales de los organismos anfitriones de producir PUFA son a veces esenciales para una metodología determinada, la ingeniería genética ha demostrado también que las capacidades naturales de algunos anfitriones (incluso los limitados de forma nativa a la producción de ácido graso LA y ALA) pueden ser alterados sustancialmente para dar como resultado producción de alto nivel de varios PUFA omega-3/omega-6 de cadena larga. Si este efecto es el resultado de capacidades naturales o tecnología recombinante, el ácido araquidónico (ARA; 20: 4 omega-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5 omega-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22: 6 omega 3) requieren la expresión bien de la ruta delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa (que opera en algunos organismos, tal como las especies de euglenoide y que se caracteriza por la producción de ácido eicosadienoico (EDA; 20:2 omega-6) y/o ácido eicosatrienoico (ETrA; 20: 3 omega-3)) o la ruta delta-6 elongasa/delta-6 desaturasa (que está situado predominantemente en algas, musgos, hongos, nematodos y seres humanos, y que se caracteriza por la producción de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3 omega-6) y/o ácido estearidónico (STA; 18: 4 omega-3)) (FIG. 1). Una delta-6 elongasa se conoce también como una elongasa $C_{18/20}$.

Las enzimas delta-8 desaturasa s identificadas hasta ahora tienen la capacidad de transformar tanto el EDA en ácido dihomo gamma-linolénico (DGLA (también conocido como HGLA); 20: 3, n-6) como el ETrA en ácido eicosatetraenoico (ETA; 20: 4, n-3). ARA y EPA son posteriormente sintetizados a partir de DGLA y ETA, respectivamente, después de la reacción con una delta-5 desaturasa. La síntesis de DHA, sin embargo, requiere la expresión posterior de una elongasa $C_{20/22}$ y una delta-4 desaturasa adicionales. La mayoría de las elongasas $C_{20/22}$ identificadas hasta ahora tienen la capacidad primaria de transformar EPA en DPA, con la actividad secundaria en la transformación de ácido araquidónico (ARA; 20: 4 omega-6) en ácido docosatetraenoico (DTA; 22: 4 omega-6), mientras que la mayoría de las enzimas delta-4 desaturasa identificadas hasta ahora tienen la capacidad primaria de transformar DPA en DHA, con actividad secundaria en la transformación de ácido docosatetraenoico (DTA; 22: 4 omega-6) en ácido docosapentaenoico omega-6 (DPAn-6; 22: 5 omega-6).

Basado en el papel que juegan las enzimas $C_{20/22}$ elongasa y delta-4 desaturasa en la síntesis de DHA, ha habido un esfuerzo considerable por identificar y caracterizar estas enzimas a partir de diversas fuentes. Como tales, se han descrito numerosas $C_{20/22}$ elongasas tanto en la literatura libre como en la literatura de patentes (por ejemplo, Pavlova sp. CCMP459 (Nº AAV33630 de acceso al Banco de Genes), Ostreococcus tauri (Nº AAV67798 de acceso al Banco de Genes) y Thalassiosira pseudonana (Nº AAV67800 de acceso al Banco de Genes)). Del mismo modo, se han descrito en la técnica varias delta-4 desaturasa s, tal como delta-4 desaturasa de Euglena gracilis que se describe en el documento WO 2004/090123 y se encontró que era particularmente específica para la transformación de ácido docopentanoico (DPA) en ácido docohexanoico (DHA) cuando se expresó en un sistema heterólogo. Otra delta-4 desaturasa se describe en WO 02/057465, que describe la expresión de dicha enzima en plantas transgénicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados. El documento WO 02/057465 también describe el enlace de la enzima desaturasa a un polipéptido adicional, que tiene una actividad enzimática distinta de la desaturasa, para formar una proteína de Fusión. También se han descrito las siguientes delta-4 desaturasa s: Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13; Nº AAQ19605 de acceso al Banco de Genes; Meyer y otros, Biochemistry, 42(32): 9779-9788 (2003)); Thalassiosira pseudonana (ID de SEC Nº: 29; Nº AAX14506 de acceso al Banco de Genes; Tonon et al., FEBS J., 272(13): 3401-3412 (2005)); Thraustochytrium aureum (ID de SEC Nº: 27; Nº

AAN75707 de acceso al Banco de Genes); Thraustochytrium sp. (Nº CAD42496 de acceso al Banco de Genes; patente de Estados Unidos 7.087.432); Schizochytrium aggregatum (ID de SEC Nº: 28; publicación PCT Nº WO 2002/090493); Pavlova lutheri (Nº AAQ98793 de acceso al Banco de Genes); y Isochrysis galbana (ID de SEC Nº: 30; Nº AAV33631 de acceso al Banco de Genes; Pereira et al., Biochem J., 384(2): 357-366 (2004); publicación PCT Nº WO 2002/090493)].

El cesionario de los solicitantes tiene un número de solicitudes de patentes en relación con la producción de PUFA en levaduras oleaginosas (es decir, Yarrowia lipolytica), que incluyen, por ejemplo: patentes de EE.UU. Nº 7.238.482 y Nº 7.125.672; publicación de Estados Unidos Nº US 2006/0115881 (presentada el 2 de noviembre de 2005); publicación de Estados Unidos Nº US 2006/0094092 (presentada el 1 de noviembre de 2005); publicación de Estados Unidos Nº 2006/0110806 (presentada el 1 de noviembre de 2005).

En relación con esto, la publicación PCT Nº WO 2004/071467 (publicada el 26 de agosto de 2004) se refiere a la producción de PUFA en plantas, mientras que la publicación PCT Nº WO 2004/071178 (publicada el 26 de agosto de 2004) se refiere a promotores de anexina y su uso en la expresión de transgenes en las plantas. Ambas son solicitudes pendientes del cesionario.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una multienzima que comprende un único polipéptido que tiene al menos dos actividades enzimáticas independientes y separables, en donde dichas actividades enzimáticas comprenden al menos una elongasa de ácido graso unida a al menos una desaturasa de ácido graso, en donde dicha elongasa está unida a dicha desaturasa y dicha unión se selecciona del grupo que consiste en ID de SEC Nº: 198 (enlazador EgDHAsyn1), ID de SEC Nº: 200 (enlazador EgDHAsyn2), ID de SEC Nº: 235 (enlazador EaDHAsyn1), ID de SEC Nº: 438, ID de SEC Nº: 445, ID de SEC Nº: 472 y ID de SEC Nº: 504.

En una realización adicional, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una multienzima como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que el polinucleótido comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una actividad de la sintasa del DHA, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento de alineamiento Clustal V, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se expone en las ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96, o ID de SEC Nº: 97;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una actividad de la sintasa del DHA en donde la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento de alineamiento BLASTN, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en las ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 205, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, o ID de SEC Nº: 410;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una actividad de la sintasa del DHA, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en las ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 205, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, o ID de SEC Nº: 410; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarias.

En otra realización, la invención se refiere al polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad de la sintasa del DHA en donde la secuencia de nucleótidos comprende ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93 o ID de SEC Nº: 410.

En una realización adicional más, la invención se refiere al polipéptido de la invención que tiene una actividad de la sintasa del DHA, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende las ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96 o ID de SEC Nº: 97.

En el presente documento se describe un polinucleótido aislado que codifica una elongasa C20 que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad elongasa C20, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento de alineamiento Clustal V, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se expone en las ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96, ID de SEC Nº: 97, ID de SEC Nº: 202 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 204 (dominio EgDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 231 (dominio EaDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 232 (dominio EaDHAsyn2 de una elongasa C20) o ID de SEC Nº: 233 (dominio EaDHAsyn3 de una elongasa C20);

(b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una actividad de una elongasa C20 en donde la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento

de alineamiento BLASTN, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en las ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, ID de SEC Nº: 183, ID de SEC Nº: 188, ID de SEC Nº: 201 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID DE SEC Nº: 206 (dominio EgDHAsyn1* de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 203 (dominio EgDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 227 (dominio EaDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 228 (dominio EgDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 229 (dominio EaDHAsyn3 de una elongasa C20) o ID de SEC Nº: 230 (dominio EaDHAsyn4 de una elongasa C20);

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de la elongasa C20, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en las ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, ID de SEC Nº: 183, ID de SEC Nº: 188, ID de SEC Nº: 201 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 206 (dominio EgDHAsyn1* de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 203 (dominio EgDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 227 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 228 (dominio EaDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 229 (dominio EaDHAsyn3 de una elongasa C20) o ID de SEC Nº: 230 (dominio EaDHAsyn4 de una elongasa C20); o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

En el presente documento se describe también un polinucleótido aislado que codifica una delta-4 desaturasa que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido tiene una actividad de la delta-4 desaturasa, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento de alineamiento Clustal V, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se expone en las ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96, ID de SEC Nº: 97, ID de SEC Nº: 193, ID de SEC Nº: 215, ID de SEC Nº: 217, ID de SEC Nº: 221, ID de SEC Nº: 239, ID de SEC Nº: 240, ID DE SEC Nº: 241, ID de SEC Nº: 246, ID de SEC Nº: 247, ID de SEC Nº: 248, ID de SEC Nº: 249, ID de SEC Nº: 382, ID de SEC Nº: 384, ID de SEC Nº: 386, ID DE SEC Nº: 388, ID de SEC Nº: 404, ID de SEC Nº: 406 o ID de SEC Nº: 408;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad delta-4 desaturasa en donde la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento de alineamiento BLASTN, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en las ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, ID de SEC Nº: 192, ID de SEC Nº: 214, ID de SEC Nº: 216, ID de SEC Nº: 220, ID de SEC Nº: 236, ID de SEC Nº: 237, ID de SEC Nº: 238, ID de SEC Nº: 242, ID de SEC Nº: 243, ID de SEC Nº: 244, ID de SEC Nº: 245, ID de SEC Nº: 381, ID de SEC Nº: 383, ID de SEC Nº: 385, ID de SEC Nº: 387, ID de SEC Nº: 403, ID de SEC Nº: 405 o ID de SEC Nº: 407;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene delta-4 desaturasa, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, ID de SEC Nº: 214, ID de SEC Nº: 216, ID de SEC Nº: 220, ID de SEC Nº: 236, ID de SEC Nº: 237, ID de SEC Nº: 238, ID de SEC Nº: 242, ID de SEC Nº: 243, ID de SEC Nº: 244, ID de SEC Nº: 245, ID de SEC Nº: 381, ID de SEC Nº: 383, ID de SEC Nº: 385, ID de SEC Nº: 387, ID de SEC Nº: 403, ID de SEC Nº: 405, o ID de SEC Nº: 407; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

Un polinucleótido aislado que codifica una elongasa C20 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de las ID de SEC Nº: 183, ID de SEC Nº: 188, ID de SEC Nº: 201 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 206 (dominio EgDHAsyn1* de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 203 (dominio EgDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 227 (dominio EgDHAsyn1 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 228 (dominio EaDHAsyn2 de una elongasa C20), ID de SEC Nº: 229 (dominio EaDHAsyn3 de una elongasa C20) o la ID de SEC Nº. 230 (dominio EaDHAsyn4 de una elongasa C20)

Un polinucleótido aislado que codifica una delta-4 desaturasa, puede comprender la secuencia expuesta en las ID de SEC Nº: 192, ID de SEC Nº: 214, ID de SEC Nº: 220, ID de SEC Nº: 236, ID de SEC Nº: 237, ID de SEC Nº: 238, ID de SEC Nº: 242, ID de SEC Nº: 243, ID de SEC Nº: 244, ID de SEC Nº: 245, ID de SEC Nº: 381, ID de SEC Nº: 383, ID de SEC Nº: 385, ID de SEC Nº: 387, ID de SEC Nº: 403, ID de SEC Nº: 405 o ID de SEC Nº: 407.

En otra realización, la invención se refiere a un constructo recombinante que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados que codifican una multienzima de la invención unida de forma operable a al menos una secuencia reguladora.

En una realización adicional, la invención se refiere a una célula anfitriona que comprende en su genoma el constructo recombinante de la invención. Más particularmente, la célula anfitriona es una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende una multienzima de la invención, en donde la elongasa es una delta-9 elongasa y la

desaturasa es una delta-8 desaturasa. En otro aspecto, la elongasa es una elongasa C20, y la desaturasa es una delta-4 desaturasa.

En otra realización más, la invención se refiere a una Yarrowia sp. transformada que comprende el constructo recombinante de la invención.

En una realización más, la invención se refiere a un procedimiento para transformar una célula, que comprende transformar una célula con el constructo recombinante de la invención y seleccionar aquellas células transformadas con dicho constructo recombinante.

En una realización adicional más, la invención se refiere a un procedimiento para producir una planta transformada que comprende transformar una célula de la planta con cualquiera de los polinucleótidos que codifican una multienzima de la invención y regenerar una planta a partir de la célula transformada de la planta.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir levadura que comprende transformar una célula de levadura con cualquiera de los polinucleótidos que codifican una multienzima de la invención y cultivar la levadura a partir de la célula transformada de la levadura.

En otra realización, la invención se refiere a una planta que comprende en su genoma el constructo recombinante de la invención. También son de interés las semillas obtenidas de dichas plantas, en donde dichas semillas comprenden el constructor recombinante de la invención. También se describen en el presente documento los aceites obtenidos a partir de tales semillas, alimento o la alimentación que incorpora dicho aceite, y una bebida que incorpora el aceite de la invención.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una elongasa C20 como se expone en la ID de SEC Nº: 183 en donde al menos 147 codones son de codón optimizado para expresión en Yarrowia sp.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una elongasa C20 como se expone en la ID de SEC Nº: 188 en donde al menos 134 codones son de codón optimizado para expresión en Yarrowia sp.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima delta-4 desaturasa como se establece en la ID de SEC Nº: 192 en donde al menos 285 codones son de codón optimizado para expresión en Yarrowia sp.

En el presente documento se describe un procedimiento para fabricar una multienzima que comprende:

(a) enlazar un Cebador polipéptido con al menos un segundo polipéptido en donde cada polipéptido tiene una actividad enzimática independiente y separable; y

(b) evaluar el producto de la etapa (a) para las actividades enzimáticas independientes y separables.

En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento para alterar el perfil de los ácidos grasos de una planta de semillas oleaginosas que comprende:

a) transformar una célula de la planta de semilla oleaginosa con el constructo recombinante de la invención;

b) regenerar una planta a partir de la etapa (a) de la célula de la planta de semilla oleaginosa transformada, en donde la planta tiene un perfil de ácido graso alterado.

En otra realización más, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una multienzima como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde el polinucleótido comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA, en donde el polipéptido se expone en la ID de SEC Nº: 441, ID de SEC Nº: 454, ID de SEC Nº: 461, ID de SEC Nº: 464, ID de SEC Nº: 471, ID de SEC Nº: 515, ID de SEC Nº: 516, ID de SEC Nº: 517, ID de SEC Nº: 518 o ID de SEC Nº: 519;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifican la un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA en donde la secuencia de nucleótidos se expone en la ID de SEC Nº: 440, ID de SEC Nº: 446, ID de SEC Nº: 453, ID de SEC Nº: 460, ID de SEC Nº: 463, ID de SEC Nº: 470, ID de SEC Nº: 492, ID de SEC Nº: 493, ID de SEC Nº: 494, ID de SEC Nº: 495 o ID de SEC Nº: 496;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 440, ID de SEC Nº: 446, ID de SEC Nº: 453, ID de SEC Nº: 460, ID de SEC Nº: 463, ID de SEC Nº: 470, ID de SEC Nº: 492, ID de SEC Nº: 493, ID de SEC Nº: 494, ID de SEC Nº: 495 o ID de SEC Nº: 496; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

En otra realización más, la invención se refiere a un procedimiento para transformar el ácido linoleico en ácido dihomo-gamma-linolénico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende un constructor recombinante que codifica una sintasa de DGLA como se ha descrito anteriormente en el presente documento y una fuente de ácido linoleico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en las condiciones en las que se producen ácido dihomo gamma-linolénico.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para la transformación de ácido α-linolénico en ácido eicosatrienoico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende un constructor recombinante que codifica una sintasa de DGLA como se describe anteriormente en el presente documento y una fuente de ácido α-linolénico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en las condiciones en las que se produce ácido eicosatrienoico.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para la transformación de ácido eicosapentaenoico en ácido docosahexaenoico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende un constructor recombinante que codifica una sintasa de DHA como se describe anteriormente en el presente documento y una fuente de ácido eicosapentaenoico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en las condiciones en las que se produce ácido docosahexaenoico.

En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la transformación de ácido araquidónico en ácido docosapentanoico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende un constructor recombinante que codifica una sintasa de DHA como se describe anteriormente en el presente documento y una fuente de ácido araquidónico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en las condiciones en las que se produce ácido docosapentaenoico.

En el presente documento se describe un procedimiento para la identificación de un polipéptido que tiene una actividad delta-4 desaturasa mejorada que comprende:

a) proporcionar polipéptido delta-4 desaturasa de tipo silvestre aislado de Euglena anabena que tiene una actividad delta-4 desaturasa que se ve incrementada comparada con la actividad de de delta-4 desaturasa de la línea de base;

b) truncar el polipéptido de tipo silvestre de (a) por desde aproximadamente 1 a aproximadamente 200 aminoácidos para crear un polipéptido mutante truncado que tiene actividad delta-4 desaturasa que se ve incrementada en comparación con la delta-4 desaturasa de la línea de base.

En el presente documento se describe también una célula anfitriona microbiana que produce un ácido graso poliinsaturado y expresa polipéptidos que codifican enzimas en la siguiente ruta secuencial:

1) una desaturasa delta-9,

2) una desaturasa delta-12,

3) una delta-9 elongasa,

4) una delta-8 desaturasa,

5) una delta-5 desaturasa,

6) una desaturasa delta-17,

7) una elongasa de $C_{20/22}$, y

8) una delta-4 desaturasa;

donde los polipéptidos comprenden al menos una multienzima, una Fusión que comprende una Fusión entre al menos un par de enzimas contiguas.

Depósitos biológicos

Los Siguientes Materiales Biológicos se han depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, y llevan las siguientes designaciones, Números de acceso y fechas de depósito (Tabla 1).

Tabla 1

Depósito de la ATCC		
Descripción	Número de Accesor	Fecha de Depósito
Plásmido pKR72	ATCC PTA-6019	28 de mayo de 2004
Yarrowia lipolytica Y4128	ATCC PTA-8614	23 de agosto de 2007
Yarrowia lipolytica Y4127	ATCC PTA-8802	29 de noviembre de 2007

Breve descripción de los dibujos y listados de secuencias

La invención puede ser entendida más completamente a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos que se adjuntan y Listado de Secuencias, que forman una parte de esta solicitud.

La FIG. 1 es una ruta de ácido graso omega-3 y omega-6 representativo que proporciona la transformación de ácido mirístico a través de varios intermedios a DHA.

La FIG. 2 muestra un alineamiento Clustal W entre una porción de la secuencia de codificación de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 21), la secuencia de ADNc de la delta-4 desaturasa Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 23) (Nº AY278558 de acceso al NCBI (GI 33466345), locus AY278558, Meyer et al., Biochemistry 42(32): 9779-9788 (2003)), y la secuencia de codificación de la delta-4 desaturasa Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 24) (Meyer et al., supra).

Las FIG. 3A y 3B muestran un alineamiento Clustal W entre la secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12), EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22), y EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6).

Las FIG. 4A y 4B muestran el alineamiento Clustal W del N-término de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y el N-término de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) con EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6), Pavlova sp. CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2), elongasa 2 de PUFA Ostreococcus tauri (ID de SEC Nº: 25) (Nº AAV67798 de acceso al NCBI (GI 55852396), locus AAV67798, CDS AY591336; Meyer et al., J. Lipid Res. 45(10): 1899-1909 (2004)), y elongasa 2 de PUFA Thalassiosira pseudonana (ID de SEC Nº: 26) (Nº AAV67800 de acceso al NCBI (GI 55852441), locus AAV67800, CDS AY591338; Meyer et al., J. Lipid Res. 45(10): 1899-1909 (2004)).

Las FIG. 5A, 5B, 5C y 5D muestran el alineamiento Clustal W del C-término de EgDHAsyn1 (EgOHAsyn1_CT; aminoácidos 253-793 de ID de SEC Nº: 12; el N-término de EgDHAsyn1 no se muestra y es indicado por "...") y el C-término de EgDHAsyn2 (EgDHAsyn2_CT; aminoácidos 253-793 de ID de SEC Nº: 22, el N-término EgDHAsyn2 no se muestra y es indicado por "...") con desaturasa de ácido graso delta-4 Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13), delta-4 desaturasa Thraustochytrium aureum (ID de SEC Nº: 27) (Nº AAN75707 de acceso al NCBI (GI 25956288), locus AAN75707, CDS AF391543), delta-4 desaturasa Schizochytrium aggregatum (ID de SEC Nº: 28) (publicación PCT Nº WO 2002/090493), delta-4 desaturasa Thalassiosira pseudonana (ID de SEC Nº: 29) (Nº AAX14506 de acceso al NCBI (GI 60173017), locus AAX14506, CDS AY817156; Tonon y otros, FEBS J. 272(13): 3401-3412 (2005)), y delta-4 desaturasa Isochrysis galbana (ID de SEC Nº: 30) (Nº AAV33631 de acceso al NCBI (GI 54307110), locus AAV33631, CDS AY630574; Pereira et al., Biochem J., 384(2): 357-366 (2004) y PCT Publicación Nº WO 2002/090493).

La FIG. 6 muestra un alineamiento de los fragmentos interiores de EgDHAsyn1 (EgDHAsyn1_ NCT; aminoácidos 253-365 de ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (EgDHAsyn2_NCT; aminoácidos 253-365 de ID de SEC Nº: 22) que abarca tanto el dominio la región elongasa C20 como el de la delta-4 desaturasa (basado en homología) con los C-terminales de las elongasas C20 (EgC20elo1_CT, aminoácidos 246-298 de ID de SEC Nº: 6; PavC20elo_CT, aminoácidos 240-277 de ID de SEC Nº: 2; OtPUFAelo2_CT, aminoácidos 256-300 de ID de SEC Nº: 25; TpPUFAelo2_CT, aminoácidos 279-358 de ID de SEC Nº: 26) como los N-terminales de las desaturasa s delta-4 (EgD4_NT, aminoácidos 1-116 de la ID de SEC Nº: 13; TaD4_NT, aminoácidos 1-47 de ID de SEC Nº: 27; SaD4_NT, aminoácidos 1-47 de ID de SEC Nº: 28; TpD4_NT, aminoácidos 1-82 de ID de SEC Nº: 29; IgD4_NT, aminoácidos 1-43 de ID de SEC Nº: 30).

La FIG. 7 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pY115 (véase también la ID de SEC Nº: 33); (B) vector pBY1 de destino Yarrowia lipolytica Gateway® (véase también la ID de SEC Nº: 34); (C) vector pY159 de

destino Yarrowia lipolytica Gateway® (véase también la ID de SEC Nº: 38); y (D) pBY-EgC20elo1 (véase también la ID de SEC Nº: 39).

La FIG. 8 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pY132 (véase también la ID de SEC Nº: 40); (B) pY161 (véase también la ID de SEC Nº: 41); (C) pY164 (véase también la ID de SEC Nº: 42); y (D) pY141 (véase también la ID de SEC Nº: 49).

La FIG. 9 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pY143 (véase también la ID de SEC Nº: 52); (B) pY149 (véase también la ID de SEC Nº: 55); (C) pY150 (véase también la ID de SEC Nº: 62); y (D) pY156 (véase también la ID de SEC Nº: 64).

La FIG. 10 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pY152 (véase también la ID de SEC Nº: 67); (B) pY157 (véase también la ID de SEC Nº: 69); (C) pY153 (véase también la ID de SEC Nº: 72); y (D) pY151 (véase también la ID de SEC Nº: 76).

La FIG. 11 es un mapa de pY160 (véase también la ID de SEC Nº: 77).

La FIG. 12 muestra un cromatograma del perfil lipídico de la un extracto de célula de Euglena anabaena como se describe en los Ejemplos.

Las FIG. 13A, 13B y 13C muestran una alineamiento Clustal W de las secuencias de aminoácidos para EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98).

La FIG. 14 proporciona mapas de plásmidos para los siguiente: (A) pY165 (véase también la ID de SEC Nº: 99); (B) pY166 (véase también la ID de SEC Nº: 100); (C) pY167 (véase también la ID de SEC Nº: 101); y (D) pY168 (véase también la ID de SEC Nº: 102).

La FIG. 15 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pKR1061 (véase también la ID de SEC Nº: 111); (B) pKR973 (véase también la ID de SEC Nº: 128); (C) pKR1064 (véase también la ID de SEC Nº: 132); y (D) pKR1133 (véase también la ID de SEC Nº: 145).

FIG. 16 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pKR1105 (véase también la ID de SEC Nº: 156); (B) pKR1134 (véase también la ID de SEC Nº: 161); (C) pKR1095 (véase también la ID de SEC Nº: 167); y (D) pKR1132 (véase también la ID de SEC Nº: 170.

La FIG. 17 es un mapa de KS373 (véase también la ID de SEC Nº: 179).

La FIG. 18 muestra los perfiles de ácidos grasos, % de elongación calculados, y % de desaturación calculados para los clones (excepto pBY-EgC20elo1) mostrados en la Tabla 24.

La FIG. 19 muestra los perfiles de ácidos grasos, % de elongación calculados, y % de desaturación calculados para alimentar EPA a vector sólo control, pY141, pY143, pY149, pY156, pY157 y pY160.

La FIG. 20 muestra los perfiles de ácidos grasos, % de elongación calculados, y % de desaturación calculados para alimentar DPA a vector sólo control, pY141, pY150, pY151, pY152, pY153, pY156, pY157 y pY160.

La FIG. 21 muestra un esquema de la estructura de dominio relativo para cada constructo descrito en la Tabla 25.

La FIG. 22 muestra los perfiles de ácidos grasos, % de elongación calculados, y % de desaturación calculados para alimentar EPA, ARA y DPA a células Yarrowia transformadas con pY141 (EgDHAsyn1; ID de SEC Nº: 49) y a un vector sólo control.

La FIG. 23 muestra los perfiles de ácidos grasos para embriones individuales a partir de un caso representativo de embriones somáticos de soja transformados con vectores de expresión de soja pKR973 y pKR1064 (véase Tabla 26).

La FIG. 24 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco mejores casos de elongación en embriones de soja transformados con el vector KS373 de expresión de la soja.

La FIG. 25 resume BLASTP y los valores de identidad en porcentaje para EgC20elo1 (Ejemplo 3), EgDHAsyn1 (Ejemplo 4), y EgDHAsyn2 (Ejemplo 5).

La FIG. 26 muestra los perfiles de ácidos grasos de la alimentación de embriones de soja con EPA. Los embriones de soja fueron seleccionados a partir de las mejores actividades de la elongasa C20/delta-5 y de la delta-4 desaturasa en embriones de soja transformados con el vector pKR1105 de expresión de soja.

La FIG. 27 muestra un cromatograma del perfil lipídico de un extracto celular de Euglena gracilis como se describe en los Ejemplos.

La FIG. 28 es un mapa de pKR1183 (véase también la ID de SEC Nº: 266).

La FIG. 29 resume las secuencias de dominio la sintasa de DHA de Euglena anabaena.

La FIG. 30 es un mapa de pKR1253 (véase también la ID de SEC Nº: 270).

La FIG. 31 es un mapa de pKR1255 (véase también la ID de SEC Nº: 275).

La FIG. 32 es un mapa de pKR1189 (véase también la ID de SEC Nº: 285).

La FIG. 33 es un mapa de pKR1229 (véase también la ID de SEC Nº: 296).

La FIG. 34 es un mapa de pKR1249 (véase también la ID de SEC Nº: 297).

La FIG. 35 es un mapa de pKR1322 (véase también la ID de SEC Nº: 314).

La FIG. 36 muestra los perfiles de ácidos grasos para cinco casos transformados con pKR1189 que tienen el promedio más bajo de contenido de ALA (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados) junto con un caso (2148-3-8-1) que tiene un típico perfil de ácidos grasos de embriones de tipo silvestre para este experimento. Los ácidos grasos son identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA y ALA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso de los ácidos grasos totales (% en peso).

La FIG. 37 muestra los perfiles de ácidos grasos de cinco casos transformados con pKR1183 que tienen el promedio más alto de contenido de DGLA (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados). Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y ETA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

La FIG. 38 muestra los perfiles promedio de ácidos grasos (promedio de 10 embriones somáticos de soja) para 20 casos transformados con pKR1249 y pKR1253 que tienen el mayor ARA. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Los ácidos grasos que se enumeran como "otros" incluyen: 18:2 (5,9), 18:3 (5,9,12), STA, 20:0, 20:1 (11), 20:2 (7,11) o 20:2 (8,11) y DPA.

La FIG. 39 muestra los perfiles de ácidos grasos reales para cada embrión somático de soja a partir de un caso (AFS 5416-8-1-1) que tiene un contenido de ARA promedio de 17,0% y un contenido de EPA promedio de 1,5%. Los ácidos grasos se identifican como 16:0(palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Los ácidos grasos que se enumeran como "otros" incluyen: 18:2 (5,9), 18:3 (5, 9,12), STA, 20:0, 20:1 (11), 20:2 (7,11) o 20:2 (8,11) y DPA.

La FIG. 40 muestra los perfiles promedio de ácidos grasos (promedio de 9 o 10 embriones somáticos de soja) para 20 casos transformados con pKR1249 y pKR1255 que tienen el mayor ARA. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Los ácidos grasos que enumeran como "otros" incluyen: 18:2 (5,9), 18:3 (5,9,12), STA, 20:0, 20:1 (11), 20:2 (7,11) o 20:2 (8,11) y DPA.

La FIG. 41 muestra los perfiles de ácidos grasos para alimentar embriones con EPA. Los embriones de soja fueron seleccionados a partir de los casos con las mejores actividades de elongasa C20/delta-5 y delta-4 desaturasa en embriones de soja transformados con el vector pKR1134 de expresión de soja. Los ácidos grasos en la FIG. 41 son identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EPA, 22:0 (ácido docosanoico), DPA, 24:0 (tetracosanoico ácido), DHA y 24:1 (ácido nervónico). Las composiciones de ácidos grasos que se enumeran en la FIG. 41 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

La FIG. 42 muestra los perfiles de ácidos grasos para alimentar embriones de soja con EPA. Los embriones de soja fueron seleccionados a partir de los casos con las mejores actividades de elongasa C20/delta-5 y delta-4 desaturasa de los 20 nuevos casos analizados para soja transformada con pKR1105. Los ácidos grasos en la FIG. 42 se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EPA, 22:0 (docosanoico ácido), DPA, 24:0 (tetracosanoico ácido), DHA y 24:1 (ácido nervónico). Las composiciones de ácidos grasos que se enumeran en la FIG. 42 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

La FIG. 43 muestra un gráfico que representa las actividades relativas de casos transformados con cualquier pKR1105 (elongasa C20 y delta-4 desaturasa expresadas individualmente) o pKR1134 (elongasa C20 y delta-4 desaturasa expresadas como una Fusión), cuando los embriones de soja fueron alimentados con EPA.

La FIG. 44 representa en un diagrama el desarrollo de la cepa Y4305U3 Yarrowia lipolytica.

La FIG. 45 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZKLeuN-29E3 y (B) pY116.

La FIG. 46 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pKO2UF8289 y (B) pZKSL-555R.

La FIG. 47 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZP3-Pa777U y (B) pY117.

La FIG. 48 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZP2-2988 Y (B) pZKUE3S.

La FIG. 49 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZKL2-5U89GC y (B) pZKL1-2SP98C.

La FIG. 50 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZKUM y (B) pZKD2- 5U89A2.

La FIG. 51A representa en un diagrama el desarrollo de cepa Y4184U Yarrowia lipolytica. La FIG. 51 B proporciona un mapa de plásmido para pEgC20ES.

La FIG. 52 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZUFmEgC20ES y (B) pZKL4-220EA4. La FIG. 52C es un dibujo esquemático que muestra la superposición de la región 3' del dominio EaC20E (ID de SEC Nº: 231) con la región 5’ del dominio EaD4 (ID de SEC Nº: 246) dentro de EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95).

La FIG. 53A muestra un alineamiento entre los N-terminales de EaD4S (ID de SEC Nº: 193), EaD4S-1 (ID de SEC Nº: 382), EaD4S-2 (ID de SEC Nº: 384) y EaD4S-3 (ID de SEC Nº: 386).

La FIG. 53B muestra un alineamiento entre los N-terminales de EgD4S (ID de SEC Nº: 388), EgD4S-1 (ID de SEC Nº: 404), EgD4S-2 (ID de SEC Nº: 406) y EgD4S-3 (ID de SEC Nº: 408).

La FIG. 54 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZKLY-G204, (B) pEgC20ES-K, (C) pYNTGUS1-CNP y (D) pZKLY.

La FIG. 55 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pZUFmG9G8fu y (B) pZUFmG9A8.

La FIG. 56 es un mapa de pKR1014.

La FIG. 57 es un mapa de pKR1152.

La FIG. 58 es un mapa de pKR1151.

La FIG. 59 es un mapa de pKR1150.

La FIG. 60 es un mapa de pKR1199.

La FIG. 61 es un mapa de pKR1200.

La FIG. 62 es un mapa de pKR1184.

La FIG. 63 es un mapa de pKR1321.

La FIG. 64 es un mapa de pKR1326.

Para las FIG. 65-71, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y ETA, y las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Además, la actividad de elongación se expresa como % de elongación delta-9 de ácidos grasos C18 (% de elong. delta-9 de C18), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinada para LA y ALA se determina como: ([DGLA +ETA+EDA+ERA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA] * 100). El porcentaje de desaturación combinado de EDA y ERA se muestra como "% de desat. delta-8 de C20", determinado como: ([DGLA+ETA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA] * 100, y también se conoce como el % de desaturación global.

La FIG. 65 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1014 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos soja analizados).

La FIG. 66 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1152 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 67 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1151 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 68 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1150 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 69 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1199 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 70 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1200 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 71 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1184 que tienen el contenido medio de DGLA más alto (promedio de 5 embriones somáticos de soja analizados).

La FIG. 72 muestra una comparación de elongasas delta-9 con desaturasa s delta-8 expresadas individualmente frente a la Fusión equivalente de delta-9 elongasa-delta-8 desaturasa. Cada punto de dato representa el % de DGLA o el % de EDA promedio para 5-6 embriones (como un % de ácidos grasos totales) para todos los casos analizados, y se registra el % de DGLA promedio frente al % de EDA promedio. En (A), EgTpom representa EgD9e co-expresado con TpomD8 (pKR1014), y EgTpomfus representa la Fusión EgD9e/TpomD8 (pKR1199). En (B), Egea representa EgD9e co-expresada con EaD8 (pKR1152) y EgEafus representa la Fusión EgD9e/EaD8 (pKR1200). En (C), EaTpom representa EaD9e co-expresada con TpomD8 (pKR1151), y EaTpomfus representa la Fusión EaD9e/TpomD8 (pKR1183). En la FIG. (D), EaEa representa EaD9e co-expresada con EaD8 (pKR1150) y EaEafus representa la Fusión EaD9e/EaD8 (pKR1200).

La FIG. 73 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1322 (Experimento MSE2274) que tienen el más alto contenido medio de ARA y EPA (promedio de los 5 embriones analizados). Los ácidos grasos se identificaron como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), 18:2 (5,9), LA, ALA, EDA, ERA, SCI, DGLA, JUN (también denominado JUP), ETA, ARA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. La actividad de elongación se expresa como % de elongación delta-9 de ácidos grasos C18 (% Elo), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+ producto]) * 100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado para LA y ALA se determina como: ([DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA]) * 100. El porcentaje de desaturación delta-8 combinado de EDA y ERA se muestra como "% D8", determinado como: ([DGLA+ETA+EPA+ARA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA]) * 100. Esto también se conoce como el % de desaturación delta-8 global. El porcentaje desaturación delta-5 combinado de DGLA y ETA se muestra como "% D5", determinado como: ([EPA+ARA]/[DGLA+ETA+EPA+ARA]) * 100. Esto también se conoce como el % de desaturación delta-5 global.

La FIG. 74 muestra los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos transformados con pKR1326 (Experimento MSE2275) que tienen el contenido medio mayor de DGLA y ETA (promedio de los 5 embriones analizados). Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y DGLA y ETA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. La actividad de elongación se expresa como % de elongación delta-9 de los ácidos grasos C18 (% de elong. delta-9 de C18), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinada para LA y ALA se determina como: ([DGLA+ETA+EDA+ERA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA])*100. El porcentaje de desaturación combinado para EDA y ERA se muestra como "% de desat. delta-8 de C20", determinado como: ([DGLA+ETA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA])*100. Esto también se conoce como el % de desaturación global.

Las descripciones de las secuencias resumen el Listado de Secuencias adjunto al presente documento. El Listado de Secuencias contiene códigos de una letra para los caracteres de la secuencia de nucleótidos y los códigos individuales y de tres letras para los aminoácidos como se definen en las Normas de la IUPAC-IUB descritas en Nucleic Acids Research 13: 3021-3030 (1985) y en el Biochemical Journal 219(2): 345-373 (1984).

Las ID de SEC Nº: 1-519 son cebadores, genes que codifican ORF, proteínas (o porciones de los mismos), o plásmidos, como se identifican en la Tabla 2.

Tabla 2

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Cebador universal M13F	1	
Elongasa cCMP459 de ácido graso poliinsaturado de C20 Pavlova sp. (Nº AAV33630 de acceso al Banco de Genes)	-	2 (277 AA)
Secuencia 5' del clon eeg1c.pk005.p14.f de Euglena gracilis	3 (608 pb)	-
Secuencia de inserto completo del clon eeg1c.pk005.p14.f de Euglena gracilis	4 (1.327 pb)	-
Secuencia de codificación del clon eeg1c.pk005.p14.f ("EgC20elo1") de Euglena gracilis	5 (897 pb)	6 (298 AA)

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Cebador SeqE	7	-
Cebador SeqW	8	-
Secuencia 5' del clon eeg1c.pk016.e6.f de Euglena gracilis	9 (742 pb)	-
Secuencia de inserto completo del clon eeg1c.pk016.e6.f de Euglena gracilis	10 (2.630 pb)	-
Secuencia de codificación del clon eeg1c.pk016.e6.f (sintasa 1 de DHA o "EgDHAsyn1") de Euglena gracilis	11 (2.382 pb)	12 (793 AA)
Desaturasa delta-4 de ácido graso (Nº AAQ19605 de acceso al Banco de Genes) de Euglena gracilis	-	13 (541 AA)
Cebador M13rev	14	-
Cebador EUGel4-1	15	-
Cebador EgEloD4Mut-5	16	-
Cebador oEUGel4-2	17	-
Cebador EgDHAsyn5'	18	-
Cebador EgDHAsyn3'	19	-
Secuencia de inserto completo del clon eeg1c-1 de Euglena gracilis	20 (2.630 pb)	-
Secuencia de codificación del clon eeg1c-1 (sintasa 2 de DHA o "EgDHAsyn2") de Euglena gracilis	21 (2.382 pb)	22 (793 AA)
Secuencia de ADNc de la delta-4 desaturasa de Euglena gracilis (Nº AY278558 de acceso al Banco de Genes)	23 (2.569 pb)	-
Secuencia de codificación de delta-4 desaturasa de Euglena gracilis (Nº AY278558 de acceso al Banco de Genes)	24 (1.626 pb)	-
Elongasa 2 de PUFA (Nº AAV67798 de acceso al Banco de Genes) de Ostreococcus tauri	-	25 (300 AA)
Elongasa 2 de PUFA (Nº AAV67800 de acceso al Banco de Genes)de Thalassiosira pseudonana)	-	26 (358 AA)
Desaturasa delta-4 (Nº AAN75707 de acceso al Banco de Genes)Thraustochytrium aureum	-	27 (515 AA)
Desaturasa delta-4 (publicación del PCT Nº. WO 2002/090493) de Schizochytrium aggregatum	-	28 (509 AA)
Desaturasa delta-4 de ácido graso (Nº AAX14506 de acceso al Banco de Genes) de Thalassiosira pseudonana	-	29 (550 AA)
Desaturasa delta-4 (Nº AAV33631 de acceso al Banco de Genes)de Isochrysis galbana	-	30 (433 AA)
Plásmido pDMW263	31 (9.472 pb)	-
Plásmido pDMW237	32 (7.879 pb)	-
Plásmido pY115	33 (7.783 pb)	-
Plásmido pBY1	34 (8.704 pb)	-
Cebador oYFBA1	35	-
Cebador oYFBA1-6	36	-
Plásmido pY158	37 (6.992 pb)	-
Plásmido pY159	38 (8.707 pb)	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pBY-C20elo1	39 (8.425 pb)	-
Plásmido pY132	40 (9.677 pb)	-
Plásmido pY161	41 (9.680 pb)	-
Plásmido pY164	42 (9.701 pb)	-
Cebador EgEPAEloDom-5	43	
Cebador oEUG el4-3	44	-
Plásmido pKR1062	45 (5.914 pb)	-
Cebador EgEloD4Mut-5	46	
Cebador EgEloD4Mut-3	47	-
Plásmido pLF115-7	48 (5.914 pb)	-
Plásmido pY141	49 (9.373 pb)	-
Cebador EgDPAEloDom-3	50	-
Plásmido pHD16	51 (4.443 pb)	-
Plásmido pY143	52 (7.903 pb)	-
Cebador oEUGsyn6-2	53	-
Plásmido pKR1071	54 (4.497 pb)	-
Plásmido pY149	55 (8.005 pb)	-
Cebador oEUGsyn6-3	56	-
Plásmido pKR1091	57 (4.498 pb)	-
Plásmido pY155	58 (8.006 pb)	-
Cebador oRIG6-1	59	-
Cebador oRIG6-2	60	-
Plásmido pKR1067	61 (4.827 pb)	-
Plásmido pY150	62 (8.293 pb)	-
Plásmido pKR1097	63 (5.795 pb)	-
Plásmido pY156	64 (9.253 pb)	-
Cebador oEGslne6-1	65	-
Plásmido pKR1069	66 (4.947 pb)	-
Plásmido pY152	67 (8.413 pb)	-
Plásmido pKR1099	68 (5.915 pb)	-
Plásmido pY157	69 (9.373 pb)	-
Cebador oEUGel4-4	70	-
Plásmido pKR1073	71 (5.151 pb)	-
Plásmido pY 153	72 (8.617 pb)	-
Cebador oRSA1-1	73	-
Cebador oRSA1-2	74	-
Plásmido pKR1068	75 (5.058 pb)	-
Plásmido pY151	76 (8.524 pb)	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pY160	77 (9.484 pb)	-
Cebador EaDHAsyn5'	78	-
Cebador EaDHAsyn5'2	79	-
Cebador EaDHAsyn5'3	80	-
Cebador EaDHAsyn5'4	81	-
Cebador EaDHAsyn3'	82	-
Cebador EaDHAsyn3'2	83	-
Cebador EaDHAsyn3'3	84	-
Cebador EaDHAsyn3'4	85	-
Cebador EaDHAsyn3'5	86	-
Plásmido pLF117-1	87 (5.582 pb)	-
Plásmido pLF117-2	88 (5.607 pb)	-
Plásmido pLF117-3	89 (5.608 pb)	-
Plásmido pLF117-4	90 (5.557 pb)	-
Secuencia de codificación (sintasa 1 de DHA o "EaDHAsyn1") de Euglena anabaena	91 (2.523 pb)	95 (841 AA)
Secuencia de codificación (Sintasa 2 de DHA o "EaDHAsyn2")de Euglena anabaena	92 (2.523 pb)	96 (841 AA)
Secuencia de codificación (sintasa 3 de DHA o "EaDHAsyn3") de Euglena anabaena	93 (2.523 pb)	97 (841 AA)
Secuencia de codificación (sintasa 4 de DHA o "EaDHAsyn4") de Euglena anabaena	94 (2.442 pb)	98 (814 AA)
Plásmido pY165	99 (10.133 pb)	-
Plásmido pY166	100 (10.158 pb)	-
Plásmido pY167	101 (10.159 pb)	-
Plásmido pY168	102 (10.108 pb)	-
Cebador oEGel2-1	103	-
Plásmido pKR1055	104 (5.916 pb)	-
Plásmido pKR72	105 (7.085 pb)	-
Cebador oCon-1	106	-
Cebador oCon-2	107	-
Plásmido pKR179	108 (4.480 pb)	-
Plásmido pKR1057	109 (6.873 pb)	-
Plásmido pKR328	110 (8.671 pb)	-
Plásmido pKR1061	111 (12.844 pb)	-
Delta-9 elongasa ("EgD9elo" o "EgD9e" o gD9E") Euglena gracilis	112 (777 pb)	513 (258 AA)
Cebador oEugEL1-1	113	-
Cebador oEugEL1-2	114	-
Plásmido pKR906	115 (4.311 pb)	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pKR132	116 (3.983 pb)	-
Plásmido pKR953	117 (4.771 pb)	-
Plásmido pKR287	118 (5.492 pb)	-
Delta-5 desaturasa ("MaD5") de Mortierella alpina	119 (1.338 pb)	-
Plásmido pKR277	120 (2.577 pb)	-
Plásmido pKR952	121 (5.364 pb)	-
Plásmido pKR457	122 (5.252 pb)	-
Casete Kti/NotI/Kti3'Salb3' modificada	123 (2.635 pb)	-
Delta-8 desaturasa ("PavD8")de Pavlova lutheri	124 (1.269 pb)	-
Cebador PvDES5'Not-1	125	-
Cebador PvDES3'Not-1	126	-
Plásmido pKR970	127 (9.276 pb)	-
Plásmido pKR973	128 (11.366 pb)	-
Plásmido pKR271	129 (6.021 pb)	-
Plásmido pKR226	130 (6.524 pb)	-
Plásmido pKR886r	131 (9.892 pb)	-
Plásmido pKR1064	132 (14.066 pb)	-
Plásmido pZBL119	133 (8.503 pb)	-
Cebador oSGly-2	134	-
Cebador oSGly-3	135	-
Plásmido pPSgly32	136 (3.673 pb)	-
Plásmido pKR142	137 (4.509 pb)	-
Plásmido pKR264	138 (4.171 pb)	-
Plásmido pKR1128	139 (6.564 pb)	-
Plásmido pKS129	140 (5.671 pb)	-
Plásmido pKR606	141 (6.601 pb)	-
Plásmido pKR804	142 (6.494 pb)	-
Plásmido pKR1130	143 (10.349 pb)	-
Plásmido pKR1131	144 (4.771 pb)	-
Plásmido pKR1133	145 (12.430 pb)	-
Plásmido pKS123	146 (7.048 pb)	-
Cebador oKti5	147	-
Cebador oKti6	148	-
Plásmido pKR124	149 (4.990 pb)	-
Plásmido pKR193	150 (4.474 pb)	-
Plásmido pKR1103	151 (5.397 pb)	-
Plásmido pKR1104	152 (9.226 pb)	-
Plásmido pKR300	153 (8.649 pb)	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Desaturasa* delta-4 (retirada del sitio AscI interno) de Schizochytrium aggregatum	154 (1.607 pb)	-
Plásmido pKR1102	155 (6.851 pb)	-
Plásmido pKR1105	156 (13.424 pb)	-
Cebador oEUGsyn6-4	157	-
Plásmido pKR1107	158 (4.498 pb)	-
Plásmido pKR1112	159 (4.461 pb)	-
Plásmido pKR1115	160 (5.989 pb)	-
Plásmido pKR1134	161 (10.807 pb)	-
Delta-8 desaturasa CCMP1491 ("TpomD8") de Tetruetreptia pomquetensis	162 (1.260 pb)	514 (420 AA)
Cebador TpomNot-5	163	-
Cebador TpomNot-3	164	
Plásmido pLF 114-10	165 (4.300 pb)	-
Plásmido pKR1002	166 (5.754 pb)	-
Plásmido pKR1095	167 (11.725 pb)	-
Plásmido pKR1127	168 (5.445 pb)	-
Plásmido pKR1129	169 (9.230 pb)	-
Plásmido pKR1132	170 (11.311 pb)	-
Enlazador de sintasa 1 de DHA de Euglena gracilis	171 (54 pb)	-
Cebador MWG507	172	-
Cebador MWG509	173	-
Cebador MWG510	174	-
Cebador MWG511	175	-
EgD9elo-EgDHAsyn1Link	176 (839 pb)	-
Plásmido KS366	177 (5.213 pb)	-
KS366-EgD9elo-EgDHAsyn1Link	178 (5.559 pb)	-
Plásmido KS373	179 (6.842 pb)	-
Motivo conservado en el C-término para dominios de elongasa C20	-	180 (11 AA)
Cebador SMART IV	181	-
Cebador Adaptador del kit 3'-RACE de Invitrogen	182	-
Elongasa de C20 sintética derivada de Euglena gracilis, codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica ("EgC20ES")	183 (912 pb)	184 (303 AA)
Plásmido pEgC20ES	185 (3.632 pb)	-
motivo NG situado en el C-término de cada uno de los dominios de EgDHAsyn1, EgDHAsyn2 y EgC20elo1 de elongasa C20	-	186
motivo PENGA situado en el C-término de cada uno de los dominios de EgDHAsyn1, EgDHAsyn2 y FgC20elo1 de elongasa C20	-	187
Elongasa de C20 sintética derivada de Euglena anabaena, codón optimizado ("EaC20ES") para expresión en Yarrowia lipolytica	188 (900 pb)	189 (299 AA)

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pEaC20ES	190 (3.620 pb)	-
motivo PCENGTV situado en el C-término de cada uno de los dominios EgDHAsyn1, FgDHAsyn2 y EgC20elo1 de elongasa C20		191
Desaturasa delta-4 sintética derivada de Euglena anabaena, codón optimizado ("EaD4S") para expresión en Yarrowia lipolytica	192 (1.752 pb)	193 (583 AA)
Dominio EaDHAsyn2 (es decir, correspondiente a aminoácidos 259-841 de la ID DE SEC Nº: 96)del gen delta-4 desaturasa	194 (1.749 pb)	195 (583 AA)
Plásmido pEaD4S	196 (4.472 pb)	-
Enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 de Euglena gracilis	197 (54 pb)	198 (18 AA)
Enlazador rico en prolina EgDHAsyn2 de Euglena gracilis	199 (54 pb)	200 (18 AA)
Dominio EgDHAsyn1 de elongasa C20 de Euglena gracilis	201 (909 pb)	202 (303 AA)
Dominio EgDHAsyn2 de elongasa C20 de Euglena gracilis	203 (909 pb)	204 (303 AA)
EgDHAsyn1* (sitio NcoI interno eliminado) de Euglena gracilis	205 (2.379 pb)	-
Dominio ("EgDHAsyn1C20EloDom1") de elongasa C20 de Euglena gracilis	206 (909 pb)	-
Gen ("EgDHAsyn1C20EloDom2Linker") de fusión enlazador rico en prolina del dominio elongasa C20 EgDHAsyn1* de Euglena gracilis	207 (975 pb)	208 (325 AA)
Desaturasa delta-4 ("IgD4") de Isochrysis galbana	209 (1.299 pb)	-
Desaturasa delta-4 ("IgD4*") (sitio SbfI interno introducido) de Isochrysis galbana	210 (1.299 pb)	211 (433 AA)
Fusión en marco entre EgDHAsyn1C20EloDom3Linker y IgD4*, separado por la región del enlazador rica en prolina ("EgDHAsyn1 C20EloDom3-IgD4*")	212 (2.259 pb)	213 (753 AA)
EgDHAsyn1D4Dom1 de Euglena gracilis	214 (1.416 pb)	215 (472 AA)
EgDHAsyn1D4Dom1* de Euglena gracilis	216 (1.419 pb)	217 (473 AA)
EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1 de Euglena gracilis	218 (2.379 pb)	219 (793 AA)
EgDHAsyn1D4Dom2 de Euglena gracilis	220 (1.623 pb)	221 (541 AA)
Desaturasa delta-4 ("SaD4") de Schizochytrium aggregatum	222 (1.530 pb)	-
Desaturasa delta-4 ("SaD4*") (sitio sbfI interno introducido) de Schizochytrium aggregatum	223 (1.530 pb)	224 (510 AA)
Fusión en marco entre EgDHAsyn1C20EloDom3 y SaD4*, separados por la región del enlazador rico en prolina ("EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4*")	225 (2.490 pb)	226 (830 AA)
Dominio EaDHAsyn1 de elongasa C20 de Euglena anabaena	227 (897 pb)	231 (299 AA)
Dominio EaDHAsyn2 de elongasa C20 de Euglena anabaena	228 (897 pb)	232 (299 AA)
Dominio EaDHAsyn3 de elongasa C20 de Euglena anabaena	229 (897 pb)	233 (299 AA)
Dominio EaDHAsyn4 de elongasa C20 de Euglena anabaena	230 (897 pb)	-
Enlazador EaDHAsyn1 rico en prolina de Euglena anabaena	234 (99 pb)	235 (33 AA)
Dominio 1 EaDHAsyn1 de delta-4 desaturasa de Euglena anabaena	236 (1.527 pb)	239 (509 AA)
Dominio 1 EaDHAsyn2 de la delta-4 desaturasa de Euglena anabaena	237 (1.527 pb)	240 (509 AA)
Dominio 1 EaDHAsyn4 de la delta-4 desaturasa de Euglena anabaena	238 (1.446 pb)	241 (482 AA)

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Dominio 2 EaDHAsyn1 de la delta-4 desaturasa (que comprende enlazador rico en prolina y una porción de extremo 3' del dominio elongasa C20) de Euglena anabaena	242 (1.749 pb)	246 (583 AA)
Dominio 2 EaDHAsyn2 de la delta-4 desaturasa (que comprende enlazador rico en prolina y una porción de extremo 3' del dominio elongasa C20) de Euglena anabaena	243 (1.749 pb)	247 (583 AA)
Dominio 2 EaDHAsyn3 de la delta-4 desaturasa (que comprende enlazador rico en prolina y una porción de extremo 3' del dominio elongasa C20) de Euglena anabaena	244 (1.749 pb)	248 (583 AA)
Euglena anabaena dominio 2 EaDHAsyn4 de la delta-4 desaturasa (que comprende enlazador rico en prolina y una porción de extremo 3' del dominio elongasa C20)	245 (1.668 pb)	249 (556 AA)
Plásmido pLF121-1	250 (3.668 pb)	-
Plásmido pLF121-2	251 (3.684 pb)	-
Elongasa 1 delta-9 ("EaD9Elo1"); también denominada en el presente documento como "EaD9E" y "EaD9e" de Euglena anabaena	252 (774 pb)	254 (258 AA)
Elongasa 2 delta-9 ("EaD9Elo2") de Euglena anabaena	253 (774 pb)	255 (258 AA)
Plásmido pLF119	256 (4.276 pb)	-
Desaturasa 1 delta-5 ("EaD5Des1" o "EaD5") de Euglena anabaena	257 (1.362 pb)	258 (454 AA)
Cebador EaD9-5Bbs	259	25
Cebador EaD9-3Fusión	260	-
Cebador EgDHAsyn1Link-5fusion	261	-
EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link	262 (852 pb)	-
Plásmido pLF124	263 (5.559 pb)	-
Plásmido pKR1177	264 (5.559 pb)	-
Plásmido pKR1179	265 (7.916 pb)	-
Plásmido pKR1183	266. (9.190 pb)	-
Delta-5 desaturasa ("EgD5") de Euglena gracilis	267 (1.350 pb)	-
Plásmido pKR1237	268 (6.615 pb)	-
Plásmido pKR1252	269 (6.464 pb)	-
Plásmido pKR1253	270 (10.387 pb)	-
Cebador oEAd5-1-1	271	-
Cebador oEAd5-1-2	272	-
Plásmido pKR1136	273 (4.899 pb)	-
Plásmido pKR1139	274 (5.592 pb)	-
Plásmido pKR1255	275 (13.293 pb)	-
Plásmido pKR561	276 (7.497 pb)	-
Desaturasa delta-15 de soja (fad3) (Nº L22964 de acceso al Banco de Genes; también denominada GmFAD3B)	277 (1.143 pb)	-
Cebador HPfad3-1	278	-
Cebador HPfad3-2	279	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Amplicón HPfad3AB	280 (709 pb)	-
Cebador HPfad3-3	281	-
Amplicón HPfad3A'-2	282 (709 pb)	-
Amplicón HPfad3ABA'-2	283 (1.014 pb)	-
Plásmido pLF129	284 (4.526 pb)	-
Plásmido pKR1189	285 (8.503 pb)	-
Plásmido pKR1209	286 (4.112 pb)	-
GmFad3C (Nº AY204712 de acceso al Banco de Genes)	287 (1.143 pb)	288 (380 AA)
Cebador fad3c-5	289	-
Cebador fad3c-3	290	-
Plásmido pKR1213	291 (3.764 pb)	-
Plásmido pKR1218	292 (4.353 pb)	-
Plásmido pKR1210	293 (3.742 pb)	-
Plásmido pKR1219	294 (3.983 pb)	-
Plásmido pKR1225	295 (4.894 pb)	-
Plásmido pKR1229	296 (8.979 pb)	-
Plásmido pKR1249	297 (10.221 pb)	-
Cebador oEAd9el1-1	298	-
Cebador oLINK-1	299	-
Plásmido pKR1298	300 (4.362 pb)	-
Cebador oTPd8-1	301	-
Cebador oTPd8fus-1	302	-
Cebador oLINK-2	303	-
Cebador oLINK-1	304	304
TpomD8-EgDHAsyn1 Link	305 (1.335 pb)	-
Plásmido pKR1291	306 (4.848 pb)	-
Plásmido pKR1301	307 (4.284 pb)	-
Plásmido pKR1301R	308 (4.284 pb)	-
Plásmido pKR1311	309 (4.228 pb)	-
Plásmido pKR1304	310 (3.201 pb)	-
Plásmido pKR1309	311 (4.041 pb)	-
Plásmido pKR1313	312 (5.604 pb)	-
Plásmido pKR1315	313 (6.474 pb)	-
Plásmido pKR1322	314 (10.627 pb)	-
Plásmido pZKLeuN-29E3	315 (14.688 pb)	-
Desaturasa delta-4 ("FmD12") de Fusarium moniliforme	316 (1.434 pb)	317 (477 AA)
Delta-9 elongasa sintética derivada de Euglena gracilis, codón ("EgD9eS") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	318 (777 pb)	319 (258 AA)

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Sitio de recombinación LoxP de Escherichia coli, reconocido por una enzima Cre recombinasa	320 (34 pb)	-
Elongasa $C_{16/18}$ sintética ELO3 derivada de Mortierella alpina, codón ("ME3S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	321 (828 pb)	322 (275 AA)
Plásmido pY116	323 (8.739 pb)	-
Plásmido pKO2UF8289	324 (15.337 pb)	-
Desaturasa delta-4 ("YID12") de Yarrowia lipolytica	325 (1.936 pb)	326 (419 AA)
Delta-8 desaturasa sintética mutante ("EgD8M"; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868, derivada de ("EgD8S"; publicación del PCT Nº WO 2006/012326) de Euglena gracilis	327 (1.272 pb)	328 (422 AA)
Delta-9 elongasa ("FgD9e") de Euglena gracilis	329 (777 pb)	330 (258 AA)
Plásmido pZKSL-555R	331 (13.707 pb)	-
Delta-5 desaturasa sintética derivada de Euglena gracilis (publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0292924), codón ("EgD5S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	332(1.350 pb)	333 (449 AA)
Delta-5 desaturasa sintética derivada de Peridinium sp. CCMP626 (publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0271632), codón ("RD5S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	334 (1.392 pb)	335 (463 AA)
Delta-5 desaturasa (solicitud de patente de EE.UU. Nº 111748629) ("EgD5") de Euglena gracilis	336 (1.350 pb)	337 (449 AA)
Plásmido pZP3-Pa777U	338 (13.066 pb)	-
Desaturasa delta-17 sintética derivada de Pythium aphanidermatum, codón ("PaD17S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0125326)	339 (1.080 pb)	340 (359 AA)
Desaturasa delta-17 (solicitud de patente de EE.UU. Nº 2008/0125326) ("PaD17") de Pythium aphanidermatum	341 (1.080 pb)	342 (359 AA)
Plásmido pY117	343 (9.570 pb)	-
Gen mutante de sintasa de acetohidroxiácido (AHAS) de Yarrowia lipolytica que comprende una mutación W497L	344 (2.987 pb)	-
Plásmido pZP2-2988	345 (15.743 pb)	-
Desaturasa delta-4 sintética derivada de Fusarium moniliforme, codón ("FmD12S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	346 (1.434 pb)	347 (477 AA)
Plásmido pZKL2-5U89GC	348 (15.812 pb)	-
Gen ("YICPT1") de diacilglicerol colinafosfotransferasa de Yarrowia lipolytica	349 (1.185 pb)	350 (394 AA)
Plásmido pZKUE3S	351 (6.303 pb)	-
Plásmido pZKL1-2SP98C	352 (15.877 pb)	-
Plásmido pZKUM	353 (4.313 pb)	-
Gene Ura3 mutante sintético que comprende una eliminación de 33 pb desde +21 a +53, una eliminación de 1 pb a +376 y una eliminación de 3 pb desde +400 a +403 de la región codificante Ura3 (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes) de Yarrowia	354 (1.459 pb)	-
Plásmido pZKD2-5U89A2	355 (15.966 pb)	-
Diacilglicerol aciltransferasa (DGAT2) (publicación del PCT Nº WO 2005/003322; patente de EE.UU. Nº 7.267.976) de Yarrowia lipolytica	356 (2.119 pb)	357 (514 AA)

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Delta-9 elongasa sintética derivada de Eutreptiella sp. CCMP389 codón ("E389D9eS") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	358 (792 pb)	359 (263 AA)
Plásmido pZuFmEgC20ES	360 (7.904 pb)	-
Plásmido pZuFmEaC20ES	361 (7.892 pb)	-
Plásmido pZKL4-220EA4	362 (13.412 pb)	-
Lipasa 4 como locus (Nº XM_503825 de acceso al Banco de Genes) de Yarrowia lipolytica	363 (1.221 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S	364 (8.744 pb)	-
Plásmido pZuFmIgD9ES	365 (7.783 pb)	-
Cebador YL921	366	-
Cebador YL922	367	-
Cebador YL923	368	-
Cebador YL924	369	-
Cebador YL925	370	-
Cebador YL926	371	-
Plásmido pZuFmEaD4S-M1	372 (8.746 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S-M2	373 (8.747 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S-M3	374 (8.744 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S-1	375 (8.636 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S-2	376 (8.576 pb)	-
Plásmido pZuFmEaD4S-3	377 (8.531 pb)	-
Plásmido pZKL4-220EA4-1	378 (13.304 pb)	-
Plásmido pZKL4-220EA4-2	379 (13.244 pb)	-
Plásmido pZKL4-220EA4-3	380 (13.199 pb)	-
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena anabaena, codón ("EaD4S-1") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	381 (1.644 pb)	382 (547 AA)
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena anabaena codón ("EaD4S-2") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	383 (1.584 pb)	384 (527 AA)
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena anabaena, codón ("EaD4S-3") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	385 (1.539 pb)	386 (512 AA)
Desaturasa delta-4 sintética derivada de Euglena gracilis, codón ("EgD4S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	387 (1.623 pb)	388 (540 AA)
Plásmido pEgD4S	389 (4.343 pb)	-
Plásmido pZKL4-220Eg4	390 (13.283 pb)	-
Cebador YL935	391	-
Cebador YL936	392	-
Cebador YL937	393	-
Cebador YL938	394	-
Cebador YL939	395	-
Cebador YL940	396	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pEgD4S-M1	397 (4.344 pb)	-
Plásmido pEgD4S-M2	398 (4.346 pb)	-
Plásmido pEgD4S-M3	399 (4.346 pb)	-
Plásmido pZKL4-220Eg4-1	400 (13.202 pb)	-
Plásmido pZKL4-220Fq4-2	401 (13.133 pb)	-
Plásmido pZKL4-220Eg4-3	402 (13.085 pb)	-
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena gracilis, codón ("EgD4S-1") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	403 (1.542 pb)	404 (513 AA)
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena gracilis, codón ("EgD4S-2") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	405 (1.473 pb)	406 (490 AA)
Desaturasa delta-4 sintética truncada derivada de Euglena gracilis, codón ("EgD4S-3") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	407 (1.425 pb)	408 (474 AA)
Plásmido pZKLY-G204	409 (10.417 pb)	-
Sintasa de DHA sintética derivada de Euglena gracilis, codón ("EgDHAsyn1S") optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	410 (2.382 pb)	411 (793 AA)
Plásmido pEgC20ES-K	412 (3.632 pb)	-
Cebador YL973	413	-
Cebador YL974	414	-
Plásmido pYNTGUS1-CNP	415 (6.652 pb)	-
Plásmido pZKLY	416 (9.045 pb)	-
Locus (Nº AJ549519 de acceso al Banco de Genes) de lipasa 7 Yarrowia lipolytica	417 (2.173 pb)	418 (366 AA)
Delta-9 elongasa CCMP389 ("E389D9e") de Eutreptiella sp.	419 (792 pb)	420 (263 AA)
Delta-9 elongasa sintética derivada de Euglena anabaena ("EaD9eS") codón UTEX 373 optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica	421 (774 pb)	422 (258 AA)
Delta-8 desaturasa ("Eg5" o "EgD8") Euglena gracilis	423 (1.271 pb)	424 (421 AA)
Delta-8 desaturasa sintética derivada de Euglena gracilis, codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica ("D8SF" o "EgD8S")	425 (1.272 pb)	426 (422 AA)
Delta-8 desaturasa ("EaD8Des3") Euglena anabaena UTEX 373; también denominada en el presente documento como "EaD8"	427 (1.260 pb)	428 (420 AA)
Delta-8 desaturasa sintética derivada de Euglena anabaena UTEX 373, codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica ("EaD8S")	429 (1.260 pb)	430 (420 AA)
Plásmido pZuFmEgD9ES	431 (7.769 pb)	-
Plásmido pZuFmEgD9ES-Na	432 (7.778 pb)	-
Cebador YL989	433	-
Cebador YL990	434	-
Cebador YL991	435	-
Cebador YL992	436	-
Plásmido pKO2UFm8A	437 (8.428 pb)	-
Enlazador modificado GPARPAGLPPATYYDSLAV de Yarrowia	-	438 (19 AA)
Plásmido pZUFmG9G8fu	439 (9.098 pb)	-

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
una fusión génica EgD9ES/FgD8M	440 (2.106 pb)	441 (701 AA)
Plásmido pZUFmG9G8fu-B	442 (9.104 pb)	-
Cebador YL1043	443	-
Cebador YL1044	444	-
Enlazador GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS modificado de Yarrowia	-	445 (24 AA)
una fusión génica EgD9ES/EgD8M	446 (2.112 pb)	447 (703 AA)
Plásmido pEaD8S	448 (3.988 pb)	-
Cebador YL1059	449	-
Cebador YL1060	450	-
Plásmido pEaD8S-B	451 (3.990 pb)	-
Plásmido pZUFmG9A8	452 (9.101 pb)	-
Fusión genes EgD9ES/EaD8S	453 (2.109 pb)	454 (702 AA)
Plásmido pZUFmEaD9ES	455 (7.769 pb)	-
Plásmido pZUFmEaD9ES-Na	456 (7.775 pb)	-
Cebador YL1049	457	-
Cebador YL1050	458	-
Plásmido pZUFmA9G8	459 (9.104 pb)	-
una fusión génica EaD9ES/EgD8M	460 (2.112 pb)	461 (703 AA)
Plásmido pZUFmA9A8	462 (9.101 pb)	-
una fusión génica EaD9ES/EaD8S	463 (2.109 pb)	464 (702 AA)
Plásmido pE389S	465 (3.523 pb)	-
Plásmido pE389S-Na	466 (3.529 pb)	-
Cebador YL1051	467	-
Cebador YL1052	468	-
Plásmido pZUFmR9G8	469 (9.119 pb)	-
una fusión génica E389D9eS/EgD8M	470 (2.127 pb)	471 (708 AA)
Enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 mas 4 aminoácidos		472 (22 AA)
Plásmido pKR1007	473 (6.267 pb)	
Plásmido pKR1014	474 (11.459 pb)	
Cebador EaD8-5	475 (34 pb)	
Cebador EaD8-3	476 (30 pb)	
Plásmido pLF120-3	477 (4.794 pb)	
Plásmido pKR1138	478 (6.526 pb)	
Plásmido pKR1152	479 (11.707 pb)	
Cebador oEAd9el1-2	480 (26 pb)	
Plásmido pKR1137	481 (4310 pb)	

Resumen de los Números de ID de SEC de Ácidos nucleicos y Proteínas		
Descripción y Abreviaturas	ID de SEC de ácido nucleico Nº	ID de SEC de proteína Nº
Plásmido pKR1140	482 (7.872 pb)	
Plásmido pKR1145	483 (6.526 pb)	
Plásmido pKR1151	484 (11.706 pb)	
Plásmido pKR1150	485 (11.706 pb)	
Plásmido pKR1190	486 (5.559 pb)	
Plásmido pKR1195	487 (6.833 pb)	
Plásmido pKR1199	488 (9.190 pb)	
Plásmido pKR1196	489 (6.833 pb)	
Plásmido pKR1200	490 (9.190 pb)	
Plásmido pKR1184	491 (9.190 pb)	
Fusión EgD9e/TpomD8	492 (2.103 pb)	515 (700 AA)
Fusión EgD9e/EaD8	493 (2.103 pb)	516 (700 AA)
Fusión EaD9e/TpomD8	494 (2.103 pb)	517 (700 AA)
Fusión EaD9e/EaD8	495 (2.103 pb)	518 (70.0 AA)
Fusión EgD9e/PavD8	496 (2.192 pb)	519 (703 AA)
Plásmido pKR1303	497 (3.967 pb)	
Plásmido pKR1308	498 (4.754 pb)	
Plásmido pKR393	499 (5.250 pb)	
Plásmido pKR407	500 (4.140 pb)	
Plásmido pKR1018	501 (5.414 pb)	
Plásmido pKR1312	502 (5.731 pb)	
Plásmido pKR1321	503 (9.198 pb)	
Enlazador rico en prolina EaDHAsyn1 mas 3 aminoácidos		504 (36 AA)
Cebador EaLink1	505 (35 pb)	
Cebador EaLink2	506 (35 pb)	
Cebador EaLink3	507 (19 pb)	
EaD9e-EaDHAsyn1Link	508 (894 pb)	
Plásmido pKR1305	509 (4.405 pb)	
Plásmido pKR1317	510 (3.201 pb)	
Plásmido pKR1320	511 (5.816 pb)	
Plásmido pKR1326	512 (9.241 pb)	

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a multienzimas, tales como sintasa de DHA. Estas son útiles para, entre otras cosas, la manipulación de las vías bioquímicas para la producción de los PUFA saludables y más específicamente para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA). Así, la invención sujeto presenta muchas aplicaciones. Los PUFA, o derivados de los mismos, elaborados por la metodología descrita en el presente documento pueden ser utilizados como sustitutos dietéticos o suplementos, particularmente, los preparados infantiles, para pacientes sometidos a una alimentación intravenosa o para prevenir o tratar la malnutrición.

Alternativamente, los PUFA (o sus derivados) purificados se pueden incorporar en los aceites, grasas o margarinas para cocinar formuladas de modo que, en el uso normal, el receptor recibiría la cantidad deseada para como

suplemento dietético. Los PUFA también se pueden incorporar en los preparados infantiles, suplementos nutricionales u otros productos alimenticios y puede encontrar uso como agentes anti-inflamatorios o reductores del colesterol. Opcionalmente, las composiciones pueden usarse para uso farmacéutico (humano o veterinario). En este caso, los PUFA se administran generalmente por vía oral, pero pueden ser administrados por cualquier ruta por la que puedan ser absorbidos con éxito, por ejemplo, de forma parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal, vaginal o por vía tópica (por ejemplo, como un ungüento o loción para la piel).

La suplementación de los seres humanos o animales con los PUFA producidos por medios recombinantes puede dar como resultado un aumento de los niveles de PUFA añadidos, así como su progenie metabólica. Por ejemplo, el tratamiento con EPA puede dar como resultado no solo mayores niveles de EPA, sino también productos secuencia abajo de EPA, tal como los eicosanoides (es decir, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos). Mecanismos reguladores complejos pueden hacerlo deseable para combinar varios PUFA, o añadir diferentes conjugados de los PUFA, con el fin de prevenir, controlar o superar tales mecanismos para alcanzar los niveles deseados de PUFA específicos en un individuo.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una pluralidad de tales plantas, la referencia a "una célula" incluye una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

El término "invención" o "presente invención" como se utiliza en el presente documento no está destinado a ser limitante de ninguna otra realización específica de la invención, pero aplica generalmente a cualquiera y todas las realizaciones de la invención como se describe en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva.

En el contexto de esta descripción, se utilizan una serie de términos y abreviaturas. Se proporcionan las siguientes definiciones.

"Marco de lectura abierto" se abrevia ORF.

"Reacción en cadena de la polimerasa" se abrevia PCR.

"Colección de Cultivo Tipo Americano " se abrevia ATCC.

"Ácido o ácidos Grasos Poliinsaturados" se abrevia PUFA.

"Triacilgliceroles" se abrevia TAG.

Los términos "Regular por disminución o Regulación por disminución", como se usa en el presente documento, se refieren a una reducción o disminución en el nivel de expresión de un gen o polinucleótido.

El término "multienzima" se refiere a un polipéptido individual que tiene al menos dos actividades enzimáticas independientes y separables. Preferiblemente, el multienzima comprende una primera actividad enzimática ligada a una segunda actividad enzimática.

La expresión "proteína de fusión" se usa indistintamente con el término "multienzima". Así, una "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido individual que tiene al menos dos actividades enzimáticas independientes y separables.

La expresión "gen de fusión" se refiere a un polinucleótido o un gen que codifica una multienzima. Un fusión génica puede construirse uniendo al menos dos fragmentos de ADN, en donde cada fragmento de ADN codifica una actividad de la enzima independiente y separada. Un ejemplo de una fusión génica se describe en el presente documento más adelante en el ejemplo 38, en donde el fusión génica sintasa Hybrid1-HGLA se construyó uniendo la delta-9 elongasa Euglena anabaena (EaD9elo1; ID de SEC Nº: 252) y la delta-8 desaturasa CCMP1491 Tetruetreptia pomquetensis (TpomD8; ID de SEC Nº: 162), utilizando el enlazador rico en prolina de la sintasa 1 DHA Euglena gracilis (EgDHAsyn1Link; ID de SEC Nº: 197).

Un "dominio" o "dominio funcional" es una parte o subsecuencia continua, discreta, de un polipéptido que se puede asociar con una función (por ejemplo, actividad enzimática). Como se utiliza en el presente documento, el término "dominio" incluye pero no se limita a enzimas biosintéticas de ácidos grasos y a porciones de enzimas de ácidos grasos que retienen actividad enzimática.

"Sintasa de DHA" es un ejemplo de una multienzima. Específicamente, una sintasa de DHA comprende una elongasa C20 ligada a una delta-4 desaturasa utilizando cualquiera de los enlazadores descritos en el presente documento. Otro ejemplo de una multienzima es un polipéptido individual que comprende una delta-9 elongasa ligada a una delta-8 desaturasa como se discute a continuación.

El término "enlace" se refiere a la unión o ligadura de al menos dos polipéptidos que tienen actividades enzimáticas independientes y separables.

El término "enlazador" se refiere a la unión o enlace entre dos o mas polipéptidos que tienen cada uno actividades enzimáticas independientes y separables.

El enlace utilizado para formar una multienzima esta mínimamente comprendido por un único enlace polipéptido. Un enlace puede estar comprendido por un resto aminoácido, tal como prolina, o un polipéptido. Si el enlace es un polipéptido, puede ser deseable que el enlace tenga al menos un resto de aminoácido prolina.

Un ejemplo de un enlazador se muestra en la ID de SEC Nº: 198 (enlazador EgDHAsyn1 rico en prolina).

El término "ácidos grasos" se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanoicos) de longitudes de cadena variables, desde aproximadamente de C_{12} a C_{22} (aunque se conocen ácidos de longitudes de cadena más largas y más cortas). Las longitudes de cadena predominantes están entre C_{16} y C_{22}. Los detalles adicionales concernientes a la diferenciación entre "ácidos grasos saturados" frente a "ácidos grasos insaturados", "ácidos grasos monoinsaturados" frente a "ácidos grasos poliinsaturados" (o "PUFA") y “ácidos grasos omega-6” (ω-6 o n-6) frente a "ácidos grasos omega-3" (omega-3 o n-3) se proporcionan en la patente de EE.UU. 7.238.482.

Los ácidos grasos se describen en el presente documento mediante un sistema de notación sencillo de "X:Y", en donde X es el número total de átomos de carbono (C) en el ácido graso particularmente e Y es el número de dobles enlaces. El número que sigue a la designación del ácido graso indica la posición del doble enlace del extremo carboxilo del ácido graso con el afijo "c" para la configuración cis del doble enlace (por ejemplo, ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1, 9c), ácido petroselínico (18:1, 6c), LA (18:2, 9c, 12c), GLA (18:3, 6c, 9c, 12c) y ALA (18:3, 9c, 12c, 15c)). A menos que se indique lo contrario, 18:1, 18:2 y 18:3 se refieren a los ácidos grasos oleico, LA y ALA, respectivamente. Si no se escribe específicamente de otro modo, se supone que los dobles enlaces están en configuración cis. Por ejemplo, los dobles enlaces en 18:2 (9,12) se supone que estarían en configuración cis.

La nomenclatura utilizada para describir los PUFA en la presente divulgación se muestran más adelante en la Tabla 3. En la columna titulada "Notación Abreviada", el sistema omega-referencia se utiliza para indicar el número de carbonos, el número de dobles enlaces y la posición del doble enlace más cercano al carbono omega, contando desde el carbono omega (que es el número 1 para este fin). El resto de la tabla resume los nombres comunes de ácidos grasos omega-3 y omega-6 y sus precursores, las abreviaturas que se utilizarán a lo largo del resto de la memoria descriptiva y el nombre químico de cada uno de los compuestos.

Tabla 3

Nomenclatura de ácidos grasos poliinsaturados y precursores			
Nombre común	Abreviatura	Nombre químico	Notación Abreviada
mirístico	--	tetradecanoico	14:0
palmítico	PA o Palmitato	hexadecanoico	16:0
palmitoleico	--	9-hexadecenoico	16:1
esteárico	--	octadecanoico	18:0
oleico	--	cis-9-octadecenoico	18:1
linoleico	LA	cis-9,12-octadecadienoico	18:2 ω-6
gamma-linolénico	GLA	cis-6,9,12-octadecatrienoico	18:3 ω-6
eicosadienoico	EDA	cis-11,14-eicosadienoico	20:2 ω-6
dihomo-gamma-linolénico	DGLA o HGLA (usados indistintamente en el presente documento)	cis-8,11,14-eicosatrienoico	20:3 ω-6
esciadónico	SCI	cis-5,11,14-eicosatrienoico	20:3b ω-6
araquidónico	ARA	cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 ω-6
alfa-linolénico	ALA	cis-9,12,15-octadecatrienoico	18:3 ω-3
estearidónico	STA	cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 ω-3

Nomenclatura de ácidos grasos poliinsaturados y precursores			
Nombre común	Abreviatura	Nombre químico	Notación Abreviada
eicosatrienoico	ETrA o ERA	cis-11,14,17-eicosatrienoico	20:3 ω-3
eicosatetraenoico	ETA	cis-8,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4 ω-3
juniperónico	JUP	cis-5,11,14,17-eicosatrienoico	20:4b ω-3
eicosapentaenoico	EPA	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 ω-3
docosatrienoico	DRA	cis-10,13,16-docosatrienoico	22:3 ω-3
docosatetraenoico	DTA	cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 ω-3
docosapentaenoico	DPAn-6	cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 ω-6
docosapentaenoico	DPA	cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 ω-3
docosahexaenoico	DHA	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 ω-3

Un vía metabólica, o biosintética, en un sentido bioquímico, pueden considerarse como una serie de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula, catalizadas por enzimas, para lograr bien la formación de la un producto metabólico que se utilizará o almacenado por la célula, o el inicio de otra vía metabólica (entonces llamada una paso de generación de flujo). Muchas de estas vías son elaboradas, y suponen una modificación paso a paso de la sustancia inicial para darle forma en un producto que tenga la estructura química exacta deseada.

La expresión "vía biosintética PUFA" se refiere a la un proceso metabólico que transforma el ácido oleico en LA, EDA, GLA, DGLA, ARA, DTA, DPAn-6, ALA, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA Y DHA. Este proceso está bien descrito en la bibliografía (por ejemplo, véase la publicación del PCT Nº WO 2006/052870). De forma simplista, este proceso implica la elongación de la cadena de carbono por la adición de átomos de carbono y desaturación de la molécula por la adición de dobles enlaces, a través de una serie de enzimas especiales de desaturación y elongación (es decir, "enzimas de la vía biosintética de PUFA") presentes en el membrana del retículo endoplasmático. Más específicamente, "enzima de la vía biosintética de los PUFA" se refiere a cualquiera de las siguientes enzimas (y los genes que codifican dichas enzimas) asociadas con la biosíntesis de un PUFA, que incluyen: una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una desaturasa delta-15, una desaturasa delta-17, una desaturasa delta-9, una delta-8 desaturasa, una delta-9 elongasa, una elongasa $C_{14/16}$, una elongasa $C_{16/18}$, una elongasa $C_{18/20}$, una elongasa $C_{20/22}$, una sintasa de DHA y/o una multienzima de la presente invención.

La expresión "vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6" se refiere a un conjunto de genes que, cuando se expresa en las condiciones apropiadas codifican enzimas que catalizan la producción de uno o ambos ácidos grasos omega-3 y omega- 6. Típicamente, los genes implicados en la vía biosintética de los ácidos grasos omega-3/omega-6 codifican enzimas de la vía biosintética de los PUFA. Una vía representativa se ilustra en la FIG. 1, que proporciona la transformación de ácido mirístico a través de varios intermedios de DHA, que demuestra cómo ambos ácidos grasos omega-3 y omega-6 pueden ser producidos a partir de una fuente común. La vía se divide de forma natural en dos porciones donde una porción generará ácidos grasos omega-3 y la otra porción, los ácidos grasos omega-6.

El término "funcional" como se utiliza en el presente documento en el contexto de la vía biosintética de los ácidos grasos omega-3/omega-6 significa que algunos (o la totalidad) de los genes en la vía expresan enzimas activas, lo que da como resultado la catálisis in vivo o la transformación del sustrato. Debe entenderse que "vía biosintética de ácido graso omega-3/omega-6" o " vía biosintética funcional de ácido graso omega-3/omega-6" no implica que se requieran todos los genes de enzimas de la vía biosintética de los PUFA, ya que cierto número de productos de ácido graso requerirán solo la expresión de un subconjunto de los genes de esta vía.

La expresión "vía de la delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa" se refiere a una vía biosintética de PUFA que incluye como mínimo al menos una delta-6 desaturasa y al menos una elongasa $C_{18/20}$, permitiendo de ese modo la biosíntesis de DGLA y/o ETA a partir de LA y ALA, respectivamente, con GLA y/o STA como ácidos grasos

intermedios. Con la expresión de otras desaturasa s y elongasas, también puede sintetizarse ARA, DTA, DPAn-6, EPA, DPA y DHA.

La expresión "vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa" se refiere a una vía biosintética de PUFA que incluye como mínimo al menos una delta-9 elongasa y al menos una delta-8 desaturasa, permitiendo de ese modo la biosíntesis de DGLA y/o ETA de LA y ALA, respectivamente, con EDA y/o ETrA como ácidos grasos intermedios. Con la expresión de otras desaturasa s y elongasas, también pueden sintetizarse ARA, DTA, DPAn-6, EPA, DPA y DHA. Esta vía puede ser ventajosa en algunas realizaciones, ya que se excluye la biosíntesis de GLA y/o STA.

La expresión "ácido graso intermedio" se refiere a cualquier ácido graso producido en una vía metabólica de ácido graso que se pueda transformar adicionalmente en un ácido graso de un producto proyectado en esta vía por la acción de otras enzimas de la vía metabólica. Por ejemplo, cuando se produce EPA utilizando la vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa, se pueden producir EDA, EtrA, DGLA, ETA y ARA y se consideran "ácidos grasos intermedios", ya que estos ácidos grasos pueden transformarse adicionalmente en EPA a través de la acción de otras enzimas de la vía metabólica.

La expresión "ácido graso subproducto" se refiere a cualquier ácido graso producido en una vía metabólica de ácido graso que no es el producto de ácido graso pretendido de la vía ni un "ácido graso intermedio" de la vía. Por ejemplo, cuando se produce EPA utilizando la vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa, también pueden producirse ácido esciadónico (SCI) y ácido juniperónico (JUP) por la acción de una delta-5 desaturasa en cualquiera EDA o ETrA, respectivamente. Se considera que son "ácidos grasos subproductos" ya que tampoco se pueden transformar adicionalmente en EPA por la acción de otras enzimas de la ruta metabólica.

Los términos "triacilglicerol", "aceite" y "TAG" y se refieren a lípidos neutros compuestos por tres restos acilo grasos esterificados a una molécula de glicerol (y tales términos se utilizarán indistintamente a lo largo de la presente divulgación en el presente documento). Tales aceites pueden contener PUFA de cadena larga, así como ácidos grasos saturados e insaturados más cortos y ácidos grasos saturados de cadena larga. Así, "la biosíntesis de aceite" se refiere genéricamente a la síntesis de TAG en la célula.

"Porcentaje (%) de PUFA en las fracciones totales lípidos y aceite" se refiere al porcentaje de PUFA respecto a los ácidos grasos totales en esas fracciones. Ambos términos "fracción del total de lípidos" o "fracción lipídica" se refiere a la suma de todos los lípidos (es decir, neutro y polar) dentro de un organismo oleaginoso, incluyendo por ello aquellos lípidos que estén situados en la fracción de fosfatidilcolina (PC), la fracción de fosfatidiletanolamina (PE) y la fracción de triacilglicerol (TAG o aceite). Sin embargo, los Términos "lípido" y "Aceite" y se utilizarán indistintamente a lo largo de toda la memoria descriptiva.

Los términos "eficiencia de transformación" y "porcentaje de transformación del sustrato" se refieren a la eficiencia por la que una enzima en particular (por ejemplo, una desaturasa) puede transformar el sustrato en producto. La eficiencia de la transformación se mide según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100, Donde "producto" incluye el producto intermedio y todos los productos en la vía derivados de él.

"Desaturasa" es un polipéptido que puede desaturar, es decir, introducir un doble enlace, en uno o mas ácidos grasos para producir un ácido graso o precursor de interés. A pesar del uso del sistema omega-referencia a lo largo de toda la memoria descriptiva para referirse a los ácidos grasos específicos, es más conveniente indicar la actividad de una desaturasa contando desde el extremo carboxilo del sustrato utilizando el sistema-delta. Por ejemplo, las desaturasa s delta-8 desaturarán un ácido graso entre los átomos de carbono octavo y noveno numerados a partir del extremo del carboxilo terminal de la molécula y puede, por ejemplo, catalizar la transformación de EDA en DGLA y/o ETrA en ETA. Otras desaturasa s de ácidos grasos útiles incluyen, por ejemplo: (1) desaturasa s delta-5 que catalizan la transformación de DGLA en ARA y/o ETA en EPA; (2) desaturasa s delta-6 que catalizan la transformación de LA en GLA y/o ALA en STA; (3) delta-4 desaturasa s que catalizan la transformación de DPA en DHA y/o DTA en DPAn-6; (4) desaturasa s delta-12 que catalizan la transformación de ácido oleico en LA; (5) desaturasa s delta-15 que catalizan la transformación de LA en ALA y/o GLA en STA; (6) desaturasa s delta-17 que catalizan la transformación de ARA en EPA y/o DGLA en ETA; y (7) desaturasa s delta-9 que catalizan la transformación de ácido palmítico en ácido palmitoleico (16: 1) y/o ácido esteárico en ácido oleico (18:1). En la técnica, las desaturasa s delta-15 y delta-17 también se conocen en ocasiones como "desaturasa s omega-3", "desaturasa s w-3" y/o "desaturasa s n-3", basado en su capacidad para transformar ácidos grasos omega 6 en sus ácidos grasos omega-3 homólogos (por ejemplo, la transformación de LA en ALA y ARA en EPA, respectivamente).En algunas realizaciones, es lo más deseable para determinar empíricamente la especificidad de una particular desaturasa de un ácido graso, transformando un anfitrión adecuado con el gen de la desaturasa de ácido graso y determinando su efecto sobre el perfil del ácido graso del anfitrión.

El término "delta-4 desaturasa" se refiere a una enzima que desaturará un ácido graso entre los átomos de carbono cuarto y quinto numerados a partir del extremo del carboxilo-terminal de la molécula y que puede, por ejemplo, catalizar la transformación de DPA en DHA y/o DTA en DPAn-6. Para los fines del presente documento, el término "EgDHAsyn1" se refiere a una enzima sintasa de DHA (ID de SEC Nº: 12) aislada de Euglena gracilis, codificada mediante la ID de SEC Nº: 11 en el presente documento. El término "EgDHAsyn2" se refiere a una enzima sintasa de DHA (ID de SEC Nº: 22) aislada de Euglena gracilis, codificada mediante la ID de SEC Nº: 21 en el presente

documento. El término "EaDHAsyn1" se refiere a una enzima sintasa de DHA (ID de SEC Nº: 95) aislada de Euglena anabaena, codificada mediante la ID de SEC Nº: 91 en el presente documento. El término "EaDHAsyn2" se refiere a una enzima sintasa de DHA (ID de SEC Nº: 96) aislada de Euglena anabaena, codificada mediante la ID de SEC Nº: 92 en el presente documento. El término "EaDHAsyn3" se refiere a una enzima sintasa de DHA (ID de SEC Nº: 97) aislada de Euglena anabaena, codificada mediante la ID de SEC Nº: 93 en el presente documento. El término "EaDHAsyn4" se refiere a una enzima (ID de SEC Nº: 98) aislada de Euglena anabaena, codificada mediante la ID de SEC Nº: 94 en el presente documento.

La expresión "sistema elongasa" se refiere a una serie de cuatro enzimas que son responsables de la elongación de una cadena de carbonos de ácidos grasos para producir un ácido graso que sea dos carbonos más largo que el sustrato de ácido graso sobre el que actúa el sistema elongasa. Más específicamente, el proceso de elongación se produce junto con sintasa de ácido graso, por lo que CoA es la portadora de acilo (Lassner et al., Plant Cell 8: 281-292 (1996)). En el primer paso, que se ha encontrado que es tanto específico del sustrato como también limitante de la velocidad, la malonil-CoA se condensa con una acil-CoA de cadena larga para producir dióxido de carbono (CO2) y una β-cetoacil-CoA (donde el resto acilo ha sido elongado en dos átomos de carbono). Las reacciones posteriores incluyen la reducción a ß-hidroxiacil-CoA, deshidratación a enoil-CoA y una segunda reducción para producir acil-CoA elongada. Ejemplos de reacciones catalizadas por sistemas elongasa son la transformación de GLA en DGLA, STA en ETA, LA en EDA, ALA en EtrA y EPA en DPA.

Para los fines del presente documento, una enzima que cataliza la primera reacción de condensación (es decir, la transformación de malonil-CoA y de acil-CoA de cadena larga en β-cetoacil-CoA) se denominará genéricamente como "elongasa". En general, la selectividad de sustrato de elongasas es algo amplio, pero segregada tanto por la longitud de la cadena como por el grado de insaturación. En consecuencia, las elongasas pueden tener distintas especificidades. Por ejemplo, una elongasa $C_{14/16}$ utilizará un sustrato C_{14} (por ejemplo, ácido mirístico); una elongasa $C_{16/18}$ utilizará un sustrato C_{16} (por ejemplo, palmitato); una elongasa $C_{18/20}$ utilizará un sustrato C18 (por ejemplo, GLA y STA); y una elongasa $C_{20/22}$ utilizará un sustrato C_{20} (por ejemplo, ARA y EPA). De forma similar, la un "delta-9 elongasa" es capaz de catalizar la transformación de LA en EDA y/o ALA en ETrA.

Es importante señalar que algunas elongasas tienen amplia especificidad y por ello una sola enzima puede ser capaz de catalizar varias reacciones de elongasa. Así, por ejemplo, una delta-9 elongasa puede también actuar como una elongasa $C_{16/18}$, una elongasa $C_{18/20}$ y/o una elongasa $C_{20/22}$ y puede tener especificidades alternativas, pero no preferidas, para ácidos grasos delta-5 y delta-6 tales como EPA y/o GLA, respectivamente.

El término "elongasa C20 " como se utiliza en el presente documento se refiere a una enzima que utiliza un sustrato C20 tal como EPA o ARA, por ejemplo. El término "elongasa C20 /delta-5" se refiere a una enzima que utiliza un sustrato C20 con un doble enlace delta-5.

De forma similar para los fines del presente documento, el término "EgD9elo" o "EgD9e" se refiere a una delta-9 elongasa aislada a partir de Euglena gracilis (véase la ID de SEC Nº: 112; véase también la publicación de EE.UU. Nº US 2007/0118929 (presentada el 16 de noviembre de 2006, y publicada el 24 de mayo de 2007)).

Como se usa en la presente memoria, "ácido nucleico" significa un polinucleótido e incluye un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Los ácidos nucleicos también pueden incluir fragmentos y nucleótidos modificados. Así, las expresiones "polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "fragmento de ácido nucleico" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Los nucleótidos (habitualmente encontrados en su forma 5'-monofosfato) se les conoce por su designación de una sola letra de la siguiente manera: "A" para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), "C", para citidilato o desoxicitidilato, "G" para guanilato o desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato", "R" para purinas (A o G), “Y” para pirimidinas (C o T), “K” para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina y "N" para cualquier nucleótido.

Las expresiones "subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "subfragmento funcionalmente equivalente" se usan indistintamente en el presente documento. Estas expresiones se refieren a una porción o subsecuencia de la un fragmento de ácido nucleico aislado en donde la capacidad de alterar la expresión génica o producir un cierto fenotipo es retenida si o no el fragmento o subfragmento codifica una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento se puede utilizar en el diseño de genes quiméricos para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Los genes quiméricos pueden diseñarse para uso en la supresión por enlace de un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, si o no codifica una enzima activa, en la orientación de sentido o antisentido con respecto a una secuencia de promotor de la planta.

El término "dominio conservado" o "motivo” significa un conjunto de aminoácidos conservados en posiciones específicas a lo largo de una secuencia alineada de las proteínas relacionadas evolutivamente. Aunque que los aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre proteínas homólogas, los aminoácidos que están muy conservados en posiciones específicas indican aminoácidos que son esenciales en la estructura, la estabilidad o la actividad de una proteína. Las expresiones "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "que corresponde sustancialmente" se usan indistintamente en el presente documento. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en

donde los cambios en una o mas bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir un cierto fenotipo. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico descritos en el presente documento tal como supresión o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con relación al fragmento inicial no modificado.

Además, el técnico experto reconoce que las secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares también se definen por su capacidad para hibridarse (en condiciones moderadamente astringentes, p. ej., 0,5X SSC, 0,1% SDS, 60ºC) con las secuencias ejemplificadas en el presente documento, o a cualquier porción de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento y que son funcionalmente equivalentes a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento. Las condiciones de astringencia se pueden ajustar para cribar fragmentos moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos lejanamente relacionados, hasta fragmentos muy similares, tales como genes que duplican enzimas funcionales a partir de organismos estrechamente relacionados. Los lavados post-hibridación determinan las condiciones de astringencia.

El término "hibrida de forma selectiva" incluye la referencia a la hibridación, en condiciones astringentes de hibridación, de una secuencia de ácido nucleico a una secuencia diana de ácido nucleico especificado a un grado detectablemente mayor (p. ej., al menos 2 veces más de fondo) que su hibridación a secuencias de ácidos nucleicos no diana y a la exclusión sustancial de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias que se hibridan selectivamente tienen típicamente aproximadamente al menos 80% de identidad de secuencia, o 90% de identidad de secuencia, hasta e incluyendo el 100% de identidad de secuencia (es decir, totalmente complementaria) entre sí.

El término "condiciones astringentes" o "condiciones de hibridación astringentes" incluye la referencia a condiciones en las que una sonda se hibridará selectivamente en su secuencia diana. Las condiciones astringentes dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la astringencia de la hibridación y/o las condiciones de lavado, se puede identificar que las secuencias diana son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de astringencia pueden ajustarse para permitir algún desajuste en las secuencias de manera que se detecten grados inferiores de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tienen una longitud menor de aproximadamente 1.000 nucleótidos, opcionalmente una longitud menor de 500 nucleótidos.

Típicamente, las condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,5 M de iones Na, típicamente aproximadamente una concentración de 0,01 a 1,0 M de iones Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30ºC para sondas cortas (por ejemplo, 10 al 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60ºC para sondas largas (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones astringentes también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Condiciones ejemplares de baja astringencia incluyen hibridación con una solución tampón de 30 a 35% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37ºC , y un lavado en 1X a 2X de SSC (20X de SSC = 3,0 M NaCl /0,3 M de citrato trisódico) de 50 a 55ºC . Condiciones de astringencia moderada ejemplares incluyen hibridación en 40 a 45% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37ºC , y un lavado en 0,5X a 1X de SSC de 55 a 60ºC . Condiciones de alta astringencia ejemplares incluyen hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37ºC , y un lavado en 0,1X de SSC a de 60 a 65ºC .

La especificidad es típicamente la función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, la Tf puede ser aproximada de la ecuación de Meinkoth et al., Anal. Biochem.138: 267-284 (1984): Tf = 81,5ºC+16,6 (log M)+0,41 (% de GC) - 0,61 (% de form) - 500/L; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, el % de form. es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La Tf es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La Tf se reduce en aproximadamente 1ºC para cada 1% de desajuste; así, la Tf, la hibridación y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con identidad ≥ 90%, la Tf se puede disminuir 10ºC . Generalmente, se seleccionan condiciones astringentes para que sean aproximadamente 5ºC más bajas que el punto de fusión térmico (Tf) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones extremadamente astringentes pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4ºC más baja que el punto de fusión térmico (Tf); condiciones moderadamente astringentes pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10ºC más baja que el punto de fusión térmico (Tf); condiciones de baja astringencia pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20ºC más baja que el punto de fusión térmico (Tf). Utilizando la Ecuación, la hibridación y composiciones de lavado, y Tf deseada, los expertos normales entenderán que intrínsecamente se describen las variaciones en la astringencia de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de desajuste da como resultado una Tf de menos que 45ºC (solución acuosa) o 32ºC (solución de formamida) se prefiere aumentar la concentración de SSC de manera que pueda utilizarse una superior temperatura. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos está situado en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid probes, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York (1993); y Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel et al., Eds., Greene

Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995). Las condiciones de hibridación y/o lavado se pueden aplicar durante al menos 10, 30, 60, 90, 120, o 240 minutos.

"Identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos se refiere a las bases de ácido nucleico o restos de aminoácidos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada.

Así, "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineamiento óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o resto aminoácido idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando Los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Ejemplos útiles de porcentaje de identidades de secuencia incluyen 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o cualquier porcentaje número entero de 50% a 100%. Estas identidades se pueden determinar utilizando cualquiera de los programas descritos en el presente documento.

Los alineamientos de secuencias y los cálculos de porcentaje de identidad o similitud se pueden determinar utilizando diversos procedimiento s de comparación diseñados para detectar secuencias homólogas incluyen pero no se limitan al programa MegAlign® de la suite de cálculos bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Dentro del contexto de esta solicitud se entenderá que donde software de análisis de secuencias se utiliza para el análisis, que Los resultados de los análisis se basarán en los "valores por defecto" del programa referenciado, a menos que se especifique lo contrario. Como se utiliza en el presente documento "valores por defecto" significará cualquier conjunto de valores o parámetros que originalmente se carga con el software cuando el primero se inicializa.

El "procedimiento Clustal V de alineamiento " corresponde al procedimiento de alineamiento etiquetado Clustal V (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989); Higgins, DG et al., Comput. Appl. Biosci. 8: 189-191 (1992)) y está situado en el programa MegAlign® de la suite de cálculos bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Para múltiples alineamientos, los valores por defecto corresponden a PENALIZACIÓN POR ESPACIO = 10 y de PENALIZACIÓN POR LA EXTENSIÓN DEL ESPACIO = 10. Los parámetros predeterminados para alineamientos por parejas y el cálculo del porcentaje de identidad de secuencias de proteínas utilizando el procedimiento Clustal V son KTUPLE = 1, PENALIZACIÓN POR ESPACIO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONAL GUARDADA = 5. Para los ácidos nucleicos estos parámetros son KTUPLE = 2, PENALIZACIÓN POR ESPACIO = 5, VENTANA = 4 y DIAGONAL GUARDADA = 4. Después del alineamiento de las secuencias utilizando el programa Clustal V, es posible obtener el "porcentaje de identidad" mediante la visualización de la tabla de “distancias entre secuencias" en el mismo programa.

El "procedimiento Clustal W de alineamiento " corresponde al procedimiento de alineamiento etiquetado Clustal W (descrito por Higgins y Sharp, supra; Higgins, D.G. et al., supra) y encontrado en el programa MegAlign® v6.1 de la suite de cálculos bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Los parámetros por defecto para el alineamiento múltiple corresponden a PENALIZACIÓN POR ESPACIO = 10, PENALIZACIÓN POR LA EXTENSIÓN DEL ESPACIO = 0,2, Secuencias divergentes de retraso (%) = 30, Peso de transiciones de ADN = 0,5, Matriz de peso de proteína = Serie Gonnet, Matriz de peso de ADN = IUB. Después del alineamiento de las secuencias utilizando el programa Clustal W, es posible obtener un "porcentaje de identidad" mediante la visualización de la tabla de "distancias entre secuencias" en el mismo programa.

El "procedimiento BLASTN de alineamiento" es un algoritmo proporcionado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para comparar las secuencias de nucleótidos utilizando parámetros por defecto.

Un experto en la técnica comprenderá que muchos niveles de identidad de secuencia son útiles en la identificación de polipéptidos, a partir de otras especies, en donde tales polipéptidos tienen la misma o similar función o actividad. Ejemplos útiles de porcentajes de identidad incluyen pero no se limitan a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o cualquier porcentaje número entero de 50% a 100%. De hecho, cualquier identidad de los aminoácidos número entero de 80% a 100% puede ser útil en la descripción de la presente invención, tal como el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. También, de interés es cualquier complemento de longitud completa o parcial de este fragmento de nucleótidos aislado.

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica y puede incluir bien la región codificante en solitario o bien la región codificante además de las secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y que siguen (secuencias no codificantes 3’) a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como está situado en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntos en la naturaleza. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y

secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la que se presenta en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen “foráneo" se refiere a un gen que no está situado normalmente en el organismo anfitrión, pero que se introducirá en el organismo anfitrión por transferencia de genes. Los genes foráneos comprender pueden genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

El término "genoma" tal como se aplica a las células vegetales abarca no solo el ADN cromosómico que está situado dentro del núcleo, sino el ADN de orgánulos subcelulares encontrados dentro de los componentes (por ejemplo, mitocondriales, plástidos) de la célula.

Un "gen codón optimizado" es un que tiene su frecuencia de uso de codón diseñada para imitar la frecuencia de uso del codón preferido de la célula anfitriona.

Un "alelo" es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma. Cuando todos los alelos presentes en un locus dado en un cromosoma son los mismos que la planta es homocigoto en se locus. Si los alelos presentes en un locus dado en un cromosoma difieren de la planta es heterocigoto en ese locus.

"Secuencia de codificación" se refiere una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos situadas secuencia arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o secuencia abajo (secuencias no codificantes 3’) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, en el procesamiento del ARN o en la estabilidad, o en la traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir pero no se limitan a: promotores, secuencias líderes de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento del ARN, sitios de unión efectores y estructuras tallo-bucle.

"Promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una ARN DE secuencia de codificación o funcional. La secuencia promotor consiste en elementos secuencia arriba proximales y más distales, los últimos elementos a menudo referidos como potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad de l promotor, y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad del tejido de un promotor. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluido comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica comprenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos de células diferentes, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener idéntica actividad del promotor. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células en la mayoría de veces se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Constantemente están siendo descubiertos nuevos promotores de diversos tipos útiles en las células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la compilación de Okamuro, J.K., y Goldberg, R.B. Biochemistry of Plants 15: 1-82 (1989).

"Secuencia líder de la traducción" se refiere a una secuencia de polinucleótidos localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado secuencia arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario de un ARNm, a la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líderes de la traducción (Turner, R. y Foster, G.D., Mol. Biotechnol.3: 225-236 (1995)).

"Secuencias 3’ no codificantes“, "finalizadotes de la transcripción" o "secuencias de finalización" se refieren a secuencias de ADN localizadas secuencia abajo de una secuencia codificante, que incluye secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras señales reguladoras que codifican secuencias capaces de afectar el procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tractos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes de 3' está ejemplificado por Ingelbrecht, I.L., et al. Plant Cell 1: 671-680 (1989).

"Transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se refiere como el transcrito primario. Un transcrito de ARN se refiere como ARN maduro cuando es una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario. "ARN mensajero" o "ARNm" se refiere al ARN que está sin intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula. "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario a, y sintetizado a partir de, un molde de ARNm utilizando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede estar en forma monocatenaria o transformado en bicatenaria utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa 1. ARN "sentido" se refiere a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y puede ser traducido en proteína dentro de una célula o in vitro. "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario diana o ARNm, y que bloquea o reduce la expresión de un gen diana (patente

de EE.UU. Nº 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede estar con cualquier parte del transcrito del gen específico, es decir, en la secuencia 5' no codificante, en la secuencia no codificante 3', los intrones, o la secuencia codificante. "ARN funcional" se refiere a un ARN antisentido, ARN ribozima, u otro ARN que no pueda ser traducido que tenga todavía un efecto sobre los procesos celulares. Los términos" complemento" y " complemento inverso " se usan indistintamente en el presente documento con respecto a transcritos de ARNm, y están destinados a definir el ARN antisentido del mensaje.

El término "unido de forma operable" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno se ve afectada por la del otro. Por ejemplo, un promotor está unido de forma operable con una secuencia de codificación cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia de codificación (es decir, la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse de forma operable a secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido. En otros ejemplos, las regiones de ARN complementarias pueden unirse de forma operable, bien directa o indirectamente, 5' al ARNm diana, o 3’ al ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria es 5' y su complemento es 3' para el ARNm diana.

Técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándares utilizadas en el presente documento son bien conocidas en la técnica y se describen más detalladamente en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Laboratorio de Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Los procedimiento s de transformación son bien conocidos bien por los expertos en la técnica y se describen infra.

"PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos específicos de ADN y se compone de una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el ADN de doble cadena bicatenario es desnaturalizado con calor, los dos cebadores complementarios para los límites 3' del segmento diana son apareados a baja temperatura y luego extendidos a una temperatura intermedia. Un conjunto de estos tres pasos consecutivos se refiere como un "ciclo".

El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, p. ej., por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética.

Un "plásmido" o "vector" es un elemento extracromosómico que a menudo transporta genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y por lo general en forma de fragmentos de ADN de doble cadena circulares. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración del genoma, fago o secuencias de nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN de una cadena o de doble cadena, derivados de cualquier fuente, en donde un número de secuencias de nucleótidos ha sido unido o recombinado en una única constructo que es capaz de introducir un casete o casetes de expresión en una célula. "Casete de expresión" se refiere a un fragmento de ADN que contiene un gen foráneo y que tiene elementos además del gen foráneo que permiten la expresión mejorada de ese gen en un anfitrión foráneo. "Casete de transformación" se refiere a un fragmento de ADN que contiene un gen foráneo y que tiene elementos además del gen foráneo que facilitan la transformación de una particular célula anfitriona.

Las expresiones "constructo recombinante", "constructo de expresión", "constructo quimérico", "constructo", y "constructo de ADN recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Un constructo recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácido nucleico, p. ej., secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente que las encontradas en la naturaleza. Un constructo de este tipo puede ser utilizado por se mismo o puede ser usado junto con un vector. Si se usa un vector, a continuación, la elección del vector depende del procedimiento que se utilizará para transformar las células anfitrionas como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un vector de plásmido. El experto en la materia es muy consciente de los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar con éxito, seleccionar y propagar células anfitrionas que comprenden fragmentos de ácido nucleico aislados. El experto en la materia también reconocerá que diferentes casos de transformación independientes darán como resultado diferentes niveles y modelos de expresión (Jones et al., EMBO J. 4: 2411-2418 (1985); De Almeida et al., Mol. Gen. Genetics 218: 78-86 (1989)), y por ello que múltiples casos deben ser examinados con el fin de obtener líneas que presenten el nivel de expresión y modelo deseados. Tal examen puede realizarse mediante análisis Southern de ADN, análisis del Northern de expresión de ARNm, análisis de inmunotransferencia de la expresión de proteínas, o análisis fenotípico, entre otros.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de un producto final funcional (p. ej., un ARNm o una proteína [ya sea precursor o maduro]).

El término "introducido" significa proporcionar un ácido nucleico (por ejemplo, constructo de expresión) o la proteína en una célula. Introducido incluye referencia a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota, donde el ácido nucleico puede ser incorporado en el genoma de la célula, e incluye referencia a la disposición transitoria de un ácido nucleico o proteína a la célula. Introducido incluye la referencia a procedimientos

de transformación estable o transitoria, así como entrecruzamiento sexual. Así, "introducido" en el contexto de insertar un fragmento de ácido nucleico (p. ej., un constructo de expresión/constructo recombinante) en una célula, significa "transfección" o "transformación" o "transducción" e incluye referencia a la incorporación de un fragmento de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde el fragmento de ácido nucleico puede ser incorporado en el genoma de la célula (p. ej., cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), transformado en un replicón autónomo, o expresado transitoriamente (p. ej., ARNm transfectadas).

Proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado postraduccionalmente (es decir, uno de los que se ha eliminado cualquier pre- o pro-péptidos presentes en el producto de traducción primario). Proteína "precursor" se refiere al producto primario de la traducción del ARNm (es decir, con pre y pro-péptidos todavía presentes). Pre- y pro-péptidos pueden ser pero no se limitan a señales de localización intracelulares.

La "transformación estable" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo anfitrión, que incluye genomas nucleares y organulares, dando como resultado una herencia genéticamente estable. En contraste, "transformación transitoria" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo, u orgánulo que contiene ADN, de un organismo anfitrión que da como resultado la expresión génica sin integración o herencia estable. Organismos anfitriones que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos".

Como se usa en el presente documento, "transgénico" se refiere a una planta o una célula que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo. Preferiblemente, el polinucleótido heterólogo está integrado de forma estable dentro del genoma de manera que el polinucleótido se pasa sobre generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo se puede integrar en el genoma en solitario o como parte de un constructo de expresión. Transgénico se utiliza en el presente documento para incluir cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de la planta o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de ácido nucleico heterólogo que incluye aquellos transgénicos inicialmente así alterados así como también aquellos creados por cruces sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término "transgénico", como se usa en el presente documento no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) por procedimientos convencionales de cultivo de plantas o acontecimientos que existen en la naturaleza tal como fertilización cruzada aleatoria, infección viral no recombinante, transformación recombinante no bacteriana, transposición no recombinante o mutación espontánea.

"Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. "Co-supresión" se refiere a la producción de transcritos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de genes foráneos o endógenos idénticos o sustancialmente similares (patente de EE.UU. Nº 5.231.020). Constructos de co-supresión en plantas han sido previamente diseñados centrándose en la sobreexpresión de una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con un ARNm endógeno, en la orientación sentido, que da como resultado la reducción de todo ARN que tiene homología con la secuencia sobreexpresada (Vaucheret et al., Plant J. 16: 651-659 (1998); Gura, Nature 404: 804-808 (2000)). La eficiencia global de este fenómeno es baja, y la extensión de la reducción del ARN es ampliamente variable. El trabajo más recientes ha descrito el uso de estructuras "horquilla" que incorporan todo, o parte, de una secuencia de codificación de ARNm en una orientación complementaria que da como resultado una estructura potencial "tallo-bucle" para el ARN expresado (publicación PCT Nº WO 99/53050; publicación PCT Nº WO 02/00904). Esto aumenta la frecuencia de co-supresión en las plantas transgénicas recuperadas. Otra variación describe el uso de secuencias virales de plantas para dirigir la supresión, o el "silenciamiento" de secuencias que codifican ARNm proximal (publicación PCT Nº WO 98/36083). Ambos de estos fenómenos de co-supresión no se han elucidado de manera mecánica, aunque la evidencia genética ha comenzado a desentrañar esta situación compleja (Elmayan et al., Plant Cell 10: 1747-1757 (1998)).

El término "oleaginoso" se refiere a aquellos organismos que tienden a almacenar su fuente de energía en forma de lípidos (Weete, en: Fungal Lipid Biochemistry, 2ª Ed., Plenum, 1980). Una clase de plantas identificadas como oleaginosa se denominan comúnmente como "plantas de semillas oleaginosas". Ejemplos de las plantas de semillas oleaginosas incluyen, pero no se limitan a: soja (Glycine y Soja sp), lino (Linum sp), colza (Brassica sp), maíz, algodón, cártamo (Carthamus sp) y girasol (Helianthus sp).

Dentro de los microorganismos oleaginosos el contenido de aceite o TAG celular sigue generalmente una curva sigmoidea, en la que aumenta la concentración de lípidos hasta que alcanza un máximo en la fase de cultivo logarítmica tardía o estacionara temprana y luego disminuye gradualmente durante las fases estacionaria tardía y de muerte (Yongmanitchai y Ward, Appl. Environ. Microbiol. 57: 419-25 (1991)). El término "levadura oleaginosa" se refiere a aquellos microorganismos clasificados como levaduras que producen aceite. No es raro que los microorganismos oleaginosos acumulen un exceso de aproximadamente el 25% de su peso celular seco en forma de aceite. Ejemplos de levaduras oleaginosas incluyen, pero no limitan a los siguientes géneros: Yarrowia, Candida, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus, Trichosporon y Lipomyces.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "biomasa" se refiere específicamente al material de celular de levadura gastado o usado resultante de la fermentación de un anfitrión de producción recombinante que produce PUFA en cantidades comercialmente significativas, en la que el anfitrión de producción preferido es una cepa recombinante de la levadura oleaginosa, Yarrowia lipolytica. La biomasa puede estar en la forma de células

completas, lisados de células completas, células homogeneizadas, material celular parcialmente hidrolizado, y/o material celular parcialmente purificado (por ejemplo, aceite producido por microbios).

El término "Euglenophyceae" se refiere a un grupo de flagelados incoloros o fotosintéticos unicelulares ("euglenoides") encontrados viviendo en agua dulce, marina, tierra y entornos de parásitos. La clase se caracteriza por organismos unicelulares solitarios, en donde mayoría están nadando libremente y tienen dos flagelos (uno de los cuales puede no haber salido) que surjan de una invaginación anterior conocida como reservorio. Los euglenoides fotosintéticos contienen desde uno a muchos cloroplastos de hierba verde, que varían desde discos insignificantes hasta placas o cintas expandidas. Los euglenoides incoloros dependen de osmotrofia o fagotrofia para la asimilación de nutrientes. Se han descrito y clasificado aproximadamente 1.000 especies en 40 géneros y 6 órdenes. Ejemplos de Euglenophyceae incluyen pero no significa que se limiten a los siguientes géneros: Euglena, Eutreptiella y Tetruetreptia.

El término "planta" se refiere a plantas completas, órganos de las plantas, tejidos vegetales, semillas, células de las plantas, semillas y progenie de las mismas. Las células de las plantas incluyen, sin limitación, células de semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas.

"Progenie" comprende cualquier generación subsiguiente de una planta. An Overview: Microbial Biosynthesis of Fatty Acids and Triacylglycerols

En general, la acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos se activa en respuesta a la relación de carbono total frente a nitrógeno presente en el medio de cultivo. Este proceso, que lleva a la síntesis de novo de palmitato libre (16:0) en microorganismos oleaginosos, se describe en detalle en la patente de EE.UU. 7.238.482. El palmitato es el precursor de los derivados de ácidos grasos, saturados e insaturados, de cadena más larga, que se forman a través de la acción de elongasas y desaturasa s (FIG. 1).

Las TAG (unidad primaria de almacenamiento de los ácidos grasos) se forman mediante una serie de reacciones que implican: (1) la esterificación de una molécula de acil-CoA a glicerol-3-fosfato a través de una aciltransferasa para producir ácido lisofosfatídico; (2) la esterificación de una segunda molécula de acil-CoA a través de una aciltransferasa para dar 1,2-diacilglicerol-fosfato (comúnmente identificado como ácido fosfatídico); (3) la eliminación de un fosfato por la fosfatasa de ácido fosfatídico para producir 1,2-diacilglicerol (DAG); y (4) la adición de un tercer ácido graso por la acción de una aciltransferasa para formar TAG. Un amplio espectro de ácidos grasos puede ser incorporado en TAG, incluyendo ácidos grasos saturados e insaturados y ácidos grasos de cadena corta y de cadena larga.

Biosíntesis de los ácidos grasos omega

El proceso metabólico en donde el ácido oleico se transforma en ácidos grasos omega-3 /omega-6 de cadena larga implica la elongación de la cadena de carbono por la adición de átomos de carbono y la desaturación de la molécula por la adición de dobles enlaces. Esto requiere una serie de enzimas de desaturación y de elongación especiales presentes en la membrana del retículo endoplásmico. Sin embargo, como se ve en la FIG. 1 y como se describe a continuación, hay a menudo múltiples vías alternativas para la producción de un ácido graso omega-3/omega-6 de cadena larga específico.

Específicamente, todas las vías requieren la transformación inicial de ácido oleico en LA, el primero de los ácidos grasos omega-6, mediante una desaturasa delta-12. Entonces, utilizando la "vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa" y LA como sustrato, los ácidos grasos omega-6 de cadena larga se forman de la siguiente Manera: (1) EDA se transforma en LA mediante una delta-9 elongasa; (2) EDA se transforma en DGLA mediante una delta-8 desaturasa; (3) DGLA se transforma en ARA mediante una delta-5 desaturasa; (4) ARA se transforma en DTA mediante una elongasa $C_{20/22}$; y (5) DTA se transforma en DPAn-6 mediante una delta-4 desaturasa. Alternativamente, la vía "delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa" puede utilizar ALA como sustrato para producir ácidos grasos omega-3 de cadena larga como sigue: (1) LA se transforma en ALA, el primero de los ácidos grasos omega-3, mediante una desaturasa delta-15; (2) ALA se transforma en ETrA mediante una delta-9 elongasa; (3) ETrA se transforma en ETA mediante una delta-8 desaturasa; (4) ETA se transforma en EPA mediante una delta-5 desaturasa; (5) EPA se transforma en DPA mediante una elongasa $C_{20/22}$; y (6) DPA se transforma en DHA mediante una delta-4 desaturasa. Opcionalmente, los ácidos grasos omega-6 se pueden transformar en ácidos grasos omega-3; por ejemplo, ETA y EPA son producidos a partir de DGLA y ARA, respectivamente, por la actividad de desaturasa delta-17.

Vías alternativas para la biosíntesis de ácidos grasos omega-3/omega-6 utilizan una delta-6 desaturasa una elongasa $C_{18/20}$ (también conocida como delta-6 elongasa, los términos se pueden utilizar indistintamente) (es decir, la vía "delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa"). Más específicamente, LA y ALA se pueden transformar en GLA y STA, respectivamente, mediante una delta-6 desaturasa; entonces, una elongasa $C_{18/20}$ transforma GLA en DGLA y/o STA en ETA.

Se contempla que las funcionalidades particulares requeridas para introducidas e un organismo anfitrión específico para la producción de los ácidos grasos omega-3/omega-6 dependerá de la célula anfitriona (y su perfil PUFA nativo

y/o perfil desaturasa /elongasa), la disponibilidad del sustrato, y el producto (o productos) final deseado. Por ejemplo, la expresión de la vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa puede ser preferida en algunas realizaciones, en oposición a la expresión de la vía delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa, dado que los PUFA producidos a través de la anterior vía están desprovistos de GLA.

Un experto en la técnica será capaz de identificar varios genes candidatos que codifican cada una de las enzimas deseadas para la biosíntesis de ácidos grasos omega-3/omega-6. Útiles secuencias de desaturasa y elongasa pueden derivar de cualquier fuente, por ejemplo, aislada de una fuente natural (de bacterias, algas, hongos, plantas, animales, etc), producida a través de una ruta semi-sintética o sintetizada de novo. Aunque la fuente particulares de los genes de desaturasa y elongasa introducidos en el anfitrión no es crítica, las consideraciones para la elección de un polipéptido específico que tenga actividad de desaturasa o elongasa incluyen: (1) la especificidad de sustrato del polipéptido; (2) si el polipéptido o un componente del mismo es un enzima limitante de la velocidad; (3) si la desaturasa o elongasa es esencial para la síntesis de un PUFA deseado; (4) cofactores requeridos por el polipéptido; y/o, (5) si el polipéptido es modificado después de su producción (por ejemplo, mediante una quinasa o una prenil transferasa). El polipéptido expresado tiene, preferiblemente, parámetros compatibles con el entorno bioquímico de su ubicación en la célula anfitriona (véase la patente de EE.UU. 7.238.482 para detalles adicionales).

En realizaciones adicionales, también será útil considerar la eficiencia de transformación de cada desaturasa y/o elongasa particular. Más específicamente, dado que cada enzima raramente funciona con una eficiencia del 100% para transformar sustrato en producto, el perfil final de lípidos de los aceites no purificados producidos en una célula anfitriona será típicamente una mezcla de varios PUFA que consisten en el ácido graso omega-3/omega-6 deseado, así como varios PUFA intermedios aguas arriba. Así, cada eficiencia de transformación de enzima es también una variable a considerar al optimizar la biosíntesis de un ácido graso deseado.

Teniendo en mente cada una de las consideraciones anteriores, los genes candidatos que tienen las actividades de la desaturasa y elongasa apropiadas (por ejemplo, desaturasa s delta-6, elongasas $C_{18/20}$, desaturasa s delta-5, desaturasa s delta-17, desaturasa s delta-15, desaturasa s delta-9, desaturasa s delta-12, elongasas $C_{14/15}$, elongasas $C_{16/18}$, elongasas delta-9, desaturasa s delta-8, desaturasa s delta-4, elongasas $C_{20/22}$ y sintasas de DHA) pueden ser identificadas según la documentación disponible públicamente (por ejemplo, Banco de Genes), la documentación de patentes, y el análisis experimental de organismos que tienen la capacidad de producir los PUFA. Estos genes estos serán adecuados para su introducción en un organismo anfitrión específico, para activar o mejorar la síntesis de los PUFA del organismo.

Multienzimas y Enlazadores

En una realización, la presente invención se refiere a multienzima que comprende un único polipéptido que tiene al menos dos actividades enzimáticas independientes y separables, en donde dichas actividades enzimáticas comprenden al menos una elongasa de ácido graso unida al menos a una desaturasa de ácido graso, en donde dicha elongasa está enlazada a dicha desaturasa y dicho enlace se selecciona del grupo que consiste en una ID de SEC Nº: 198, ID de SEC Nº: 200, ID de SEC Nº: 235, ID de SEC Nº: 438, ID de SEC Nº: 472, ID de SEC Nº: 445 e ID de SEC Nº: 504.

Ejemplos de adecuadas desaturasa de ácido graso incluyen pero no se limitan a delta-4 desaturasa, delta-5 desaturasa, delta-6 desaturasa, delta-8 desaturasa, desaturasa delta-9, desaturasa delta-12, desaturasa delta-15, y/o desaturasa delta-17. Ejemplos de elongasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a: delta-9 elongasa, elongasa $C_{14/16}$, elongasa $C_{16/18}$, elongasa $C_{18/20}$, y/o elongasa $C_{20/22}$.

Ejemplos de transferasas incluyen aciltransferasas tales como O-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (también denominada aciltransferasa de glicerol-fosfato o aciltransferasa glicerol-3-fosfato; GPAT), O-aciltransferasa de 2-acilglicerol, O-aciltransferasa de 1-acilglicerol-3-fosfato (también denominada aciltransferasa de 1-acilglicerol-fosfato o aciltransferasa de ácido liso-fosfatídico; AGPAT o LPAAT o LPAT), O-aciltransferasa de 2-acilglicerol-3-fosfato, O-aciltransferasa de 1-acilglicerofosfocolina (también denominada aciltransferasa liso-lecitina o aciltransferasa de liso-fosfatidilcolina; AGPCAT o LLAT o LPCAT), O-aciltransferasa de 2-acilglicerofosfocolina, O-aciltransferasa de diacilglicerol (también denominada aciltransferasa diglicérido; DAGAT o DGAT) y fosfolípidos: aciltransferasa de diacilglicerol (PDAT).

Un ejemplo de una acil CoA sintetasa adecuada incluye pero no se limita a ligasa CoA de ácido graso de cadena larga (también llamada enzima de activación de acilo o sintetasa de acil-CoA).

Un ejemplo de una tioesterasa incluye hidrolasa oleoil-[proteína portadora de acilo] (también llamada hidrolasa acil-[proteína portadora de acilo], acil-ACP-hidrolasa o acil-ACP-tioesterasa).

Multienzimas incluyen sintasas del DHA (que comprende tanto la actividad elongasa C20 como la actividad de lta-4 desaturasa) y sintasas DGLA (que comprenden la actividad tanto de delta-9 elongasa como de delta-8 desaturasa). Los datos descritos en el presente documento confirman que el enlace la de los dos dominios dentro de cada sintasa da como resultado una eficiencia o flujo mejorados, en comparación con la eficiencia o flujo observado cuando los dominios enzimáticos existen como entidades independientes, es decir, no enlazados entre se en una multienzima.

Por ejemplo, cuando una multienzima que comprende el dominio elongasa C20 de Euglena gracilis y una delta-4 desaturasa de Schizochytrium aggregatum se expresaba en Yarrowia lipolytica, la actividad de delta-4 desaturasa era de aproximadamente 2 o 3 veces mayor en el constructor fusionado, a diferencia de su actividad cuando se expresaba en solitario (Ejemplo 28). De forma similar, cuando la fusión de dominio elongasa C20 de Euglena gracilis- delta-4 desaturasa de Schizochytrium aggregatum se expresaba como una multienzima en la soja, se midió un flujo de EPA a DHA aumentado, a diferencia de cuando las dos enzimas se expresaban de forma independiente (Ejemplo 49).

Una eficiencia (o flujo de LA a DGLA) aumentada mostraba también en varias de las sintasas de DGLA que se creaban. Unas series de constructos de la fusión de seis delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa eran creados utilizando varias combinaciones de elongasas delta-9 derivadas de E. gracillis, E. anabaena Utex 373 y Eutreptiella sp. CCMP389 y desaturasa s delta-8 derivadas de E. gracillis y E. anabaena Utex 373; estos se expresaron individualmente en Yarrowia lipolytica (Ejemplos 55 y 56, respectivamente). En todos los casos, el fusión génica tenía mayor actividad que el gen individual solitario cuando se expresaba en Yarrowia. Estos datos sugirieron de nuevo que el producto de la delta-9 elongasa puede ser canalizado directamente como sustrato de delta-8 desaturasa en la proteína de fusión. Un experto en la técnica sería capaz de utilizar las enseñanzas del presente documento para crear otras varias multienzimas que han aumentado la eficiencia o flujo. En consecuencia, cualquier multienzima puede fabricarse utilizando un enlazador derivado de las secuencias descritas en el presente documento. Las multienzimas incluyen aquellas que combinan varios genes de la vía de biosíntesis de los PUFA.

Identificación de las secuencias de nuevas sintasas de DHA

Las secuencias de nucleótidos que codifican sintasas de DHA se han aislado de Euglena gracilis y Euglena anabaena, tal como se resume a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

Sumario de Sintasas DHA Euglena			
Designación de Sintasa de DHA	Organismo	ID de SEC de Nucleótido Nº	ID de SEC de Aminoácido Nº
EgDHAsyn1	E. gracilis	11	12
EgDHAsyn1*	E. gracilis	205	12
EgDHAsyn2	E. gracilis	21	22
EaDHAsyn1	E. anabaena	91	95
EaDHAsyn2	E. anabaena	92	96
EaDHAsyn3	E. anabaena	93	97
EgDHAsyn1S (codón optimizado para expresión de Yarrowia)	Sintéticamente derivado de E. gracilis EgDHAsyn1	410	411 (idéntico a la ID de SEC Nº:12)

Las secuencias sintasa del DHA, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3 instantáneas, pueden ser de codón optimizado para expresión en un organismo anfitrión particular. Como es bien conocido en la técnica, esto puede ser un medio útil para optimizar aún más la expresión de la enzima en el anfitrión alternativo, ya que el uso de codón preferidos del anfitrión puede mejorar sustancialmente la expresión del gen foráneo que codifica el polipéptido. EgDHAsyn1, por ejemplo, era un codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (Ejemplo 54), produciendo de este Modo EgDHAsyn1S (como se enseña en la patente de EE.UU. 7.238.482 y en la patente de Estados Unidos 7.125.672).

Un experto en la técnica será capaz de utilizar las enseñanzas del presente documento para crear otras varias proteínas sintasa del DHA de codón optimizado adecuadas para expresión óptima en anfitriones alternativos, basado en secuencias de tipo silvestre EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1 , EaDHAsyn2 y/o secuencias EaDHAsyn3 descritas anteriormente en la Tabla 4. En consecuencia, la proteína sintasa del DHA de codón optimizado puede derivarse de una secuencia de tipo silvestre descrita en el presente documento. Puede ser deseable modificar una porción de los codones que codifican EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y/o EaDHAsyn3 para mejorar la expresión del gen en un organismo anfitrión que incluye pero no se limita a una planta o parte de una planta.

En una realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una multienzima como se define en las reivindicaciones adjuntas que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de sintasa del DHA, en la que el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento Clustal V de

alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, o la ID de SEC Nº: 97;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica la un polipéptido que tiene una actividad de sintasa del DHA en la que la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento BLASTN de alineamiento, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 205, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, o la ID de SEC Nº: 410;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de sintasa del DHA, en la que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, la ID de SEC Nº: 205, o la ID de SEC Nº: 410; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en la que el complemento y la secuencia de nucleótidos consisten en el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarias.

Preferiblemente, un polinucleótido aislado que codifica una sintasa del DHA comprende la secuencia expuesta en cualquiera de la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 205, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, o la ID de SEC Nº: 410.

Identificación y aislamiento de homólogos

Cualquiera de las presentes secuencias de sintasa del DHA (es decir, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn23) o porciones de las mismas se pueden usar para buscar homólogos de sintasa del DHA en las mismas u otras especies de bacterias, algas, hongos, euglenoide o vegetal utilizando el software de análisis de secuencias. En general, tal software informático hace coincidir secuencias similares asignando grados de homología a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones.

Alternativamente, cualquiera de las secuencias sintasa del DHA presentes o porciones de las mismas también se pueden emplear como reactivos de hibridación para la identificación de homólogos de sintasa del DHA. Los componentes básicos de un ensayo de hibridación de ácido nucleico incluyen una sonda, una muestra sospechosa de contener el gen o fragmento del gen de interés y un procedimiento de hibridación específico. Las sondas son típicamente secuencias de ácidos nucleicos monocatenarios que son complementarias de las secuencias de ácidos nucleicos que serán detectadas. Las sondas son "hibridables" con la secuencia de ácido nucleico que será detectada. Aunque la longitud de la sonda puede variar desde 5 bases hasta decenas de miles de bases, típicamente una longitud de sonda de aproximadamente 15 bases a aproximadamente 30 bases es adecuada. Solo parte de la molécula de la sonda necesita ser complementaria con la secuencia de ácido nucleico que será detectada. Además, la complementariedad entre la sonda y la secuencia diana no necesita ser perfecta. La hibridación se producir entre moléculas imperfectamente complementarias con el resultado de que una cierta fracción de las bases en la región hibridada no se empareja con la base complementaria apropiada.

Los procedimientos de hibridación están bien definidos. Típicamente, la sonda y la muestra deben mezclarse en condiciones que permitan la hibridación de ácido nucleico. Esto supone poner en contacto la sonda y la muestra en presencia de una sal inorgánica u orgánica en condiciones de concentración y temperatura adecuadas. Los ácidos nucleicos de la sonda y de la muestra deben estar en contacto durante un tiempo suficientemente largo para que se produzca cualquier posible hibridación entre la sonda y el ácido nucleico de la muestra. La concentración de sonda o diana en la mezcla determinará el tiempo necesario para que se produzca la hibridación. Cuanto mayor sea la concentración de sonda o diana, más corto será el tiempo necesario para la incubación de la hibridación. Opcionalmente, se puede añadir un agente caotrópico (por ejemplo, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio; tiocianato de sodio, tetracloroacetato de litio, perclorato de sodio, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio, trifluoroacetato de cesio). Si se desea, se puede añadir formamida a la mezcla de hibridación, típicamente 30-50% (v/v).

Pueden emplearse varias soluciones de hibridación. Típicamente, estas comprenden desde aproximadamente 20 a 60% en volumen, preferiblemente 30%, de un disolvente orgánico polar. Una solución de hibridación común emplea aproximadamente 30 a 50% v/v de formamida, aproximadamente 0,15 a 1 M de cloruro sódico, aproximadamente 0,05 a 0,1 M de tampones (por ejemplo, citrato sódico, Tris-HCl, PIPES o HEPES (intervalo de pH de aproximadamente 6-9)), aproximadamente 0,05 a 0,2% de detergente (p. ej., dodecilsulfato de sodio), o entre 0,5-20 mM de AEDT, FICOLL (Pharmacia Inc) (aproximadamente 300-500 kDa), polivinilpirrolidona (aproximadamente de 250-500 kDa), y seroalbúmina. incluidos también en la típica solución de hibridación estarán ácidos nucleicos portadores no etiquetados desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, ADN nucleico fragmentado (p. ej., ADN de timo de bovino o de esperma de salmón, o ARN de levadura), y opcionalmente de aproximadamente 0,5 a 2% peso/vol de glicina. También pueden incluirse otros aditivos, tales como agentes de exclusión de volumen que incluyen una variedad de agentes polares solubles en agua o hinchables (por ejemplo, polietilenglicol), aniónicos polímeros (por ejemplo, poliacrilato o polimetacrilato) y polímeros sacáridos aniónicos los (por ejemplo, sulfato de dextrano).

La hibridación de ácidos nucleicos es adaptable a una variedad de formatos de ensayo. Uno de los más adecuados es el formato de ensayo sándwich. El ensayo de sándwich es particularmente adaptable a la hibridación en condiciones no desnaturalizantes. Un componente principal de un ensayo de tipo sándwich es un soporte sólido. El soporte sólido tiene adsorbido en él una sonda de ácido nucleico inmobilizada que es no etiquetada y complementaria con una porción de la secuencia.

Cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos de sintasa del DHA descritos en el presente documento (o cualquiera de los homólogos identificados del mismo) se puede utilizar para aislar genes que codifican proteínas homólogas de la misma o de otras especies de bacterias, algas, hongos, euglenoide o vegetales. El aislamiento de genes homólogos utilizando protocolos dependientes de la secuencia es bien conocido en la técnica. Ejemplos de protocolos dependientes de la secuencia incluyen, pero no se limitan a: (1) procedimientos de hibridación de ácido nucleico; (2) procedimientos de amplificación de ADN y la del ARN, como se ejemplifica mediante diversos usos de tecnologías de amplificación de ácido nucleico [p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis et al., patente de EE.UU. 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor et al., Proc. Acad. Sci. EE.UU. 82:1074 (1985); o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:392(1992)]; y (3) procedimientos de construcción de biblioteca y cribado por complementación.

Por ejemplo, los genes que codifican proteínas o polipéptidos similares a multienzima o a un dominio individual de los mismos (tales como las sintasas del DHA) descritos en el presente documento, podría n ser aislados directamente mediante el uso de la totalidad o una porción de los fragmentos del presente ácido nucleico como sondas de hibridación de ADN para cribar bibliotecas de, por ejemplo, cualquier levadura u hongo deseado utilizando metodología bien conocida por los expertos en la técnica (en la que se preferirían aquellos organismos que producen DTA, DPAn-6, DPA y/o DHA). Sondas de oligomucleótidos específicos basadas en las secuencias de ácidos nucleicos presentes pueden ser diseñadas y sintetizadas por procedimientos conocidos en la técnica (Maniatis, supra). Además, la totalidad de las secuencias pueden usarse directamente para sintetizar sondas de ADN por procedimientos conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, técnicas de etiquetado de ADN con cebadores aleatorios, traducción de muesca o etiquetado terminal), o sondas de ARN que utilizan sistemas de transcripción en vitro disponibles. Además, los cebadores específicos pueden ser diseñados y utilizados para amplificar una parte de (o la longitud completa de) las secuencias presentes. Los productos de amplificación resultantes pueden ser etiquetados directamente durante las reacciones de amplificación o etiquetados después de las reacciones de amplificación, y utilizados como sondas para aislar fragmentos de ADN de longitud completa en condiciones de astringencia apropiadas.

Típicamente, en las técnicas de amplificación de tipo PCR, los cebadores tienen secuencias diferentes y no son complementarios entre sí. Dependiendo de las condiciones de ensayo deseadas, las secuencias de los cebadores deben ser diseñadas para contemplar la replicación tanto eficiente como fiel del ácido nucleico diana. Los procedimientos de diseño del cebador de la PCR son comunes y bien conocidos en la técnica (Thein y Wallace, "The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders", en Human Genetic Diseases: a Practical Approach, KE Davis Ed., (1986) pág. 33-50, IRL: Herndon, VA, y Rychlik, W., en Methods in Molecular Biology, White, B.A. Ed., (1993) Vol. 15, pág. 31-39, PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humania: Totowa, NJ).

Generalmente dos segmentos cortos de las presentes secuencias pueden usarse en protocolos de la PCR para amplificar fragmentos más largos de ácido nucleico que codifican genes homólogos de ADN o ARN. La PCR también se puede realizar en una biblioteca de fragmentos clonados de ácido nucleico en donde la secuencia de un cebador se deriva de los fragmentos presentes de ácido nucleico, y la secuencia del otro cebador se aprovecha de la presencia de los tractos de ácido poliadenílico en el extremo 3' del precursor del ARNm que codifica genes eucariotas.

Alternativamente, la segunda secuencia de cebador puede basarse en secuencias derivadas del vector de clonación. Por ejemplo, el experto en la materia puede seguir el protocolo RACE (Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:8998 (1988)) para generar ADNc utilizando la PCR para amplificar copias de la región entre un punto individual en el transcripto y el extremo 3' y 5'. Los cebadores orientados en las direcciones 3' y 5' pueden ser diseñados a partir de las presentes secuencias. Utilizando sistemas RACE 3' o RACE 5' (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), se pueden aislar fragmentos específicos de ADNc 3' o 5' (Ohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 86:5673 (1989); Loh et al., Science 243:217 (1989)).

Se puede modificar cualquiera de las enzimas (por ejemplo, multienzimas, sintasas del DHA, o dominios individuales descritos en el presente documento). Como es bien conocido por los expertos en la técnica, para obtener mutaciones de genes de origen natural se pueden emplear mutagénesis y selección in vitro, mutagénesis química, procedimientos de "transposición de genes" u otros medios. Alternativamente, multienzimas pueden sintetizarse mediante intercambio de dominios, en donde un dominio funcional de cualquier enzima puede ser intercambiado con o añadido a un dominio funcional en una enzima alternativa para dar como resultado de ese modo una nueva proteína.

Identificación de secuencias de nuevas elongasas de C20

Las secuencias de nucleótidos que codifican elongasas de C20 se han aislado de Euglena gracilis y Euglena anabaena, tal como se resume a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Sumario de Elongasas C20 Euglena			
Designación de Elongasa C20	Organismo	ID de SEC de Nucleótido Nº	ID de SEC de Aminoácido Nº
Dominio de elongasa C20 EgDHAsyn1	E. gracilis	201	202
Dominio de elongasa C20 EgDHAsyn1*	E. gracilis	206	-
Dominio de elongasa C20 EgDHAsyn2	E. gracilis	203	204
Dominio de elongasa C20 EaDHAsyn1	E. anabaena	227	231
Dominio de elongasa C20 EaDHAsyn2	E. anabaena	228	232
Dominio de elongasa C20 EaDHAsyn3	E. anabaena	229	233
Dominio de elongasa C20 EaDHAsyn4	E. anabaena	230	-
Dominio de elongasa C20 EgC20 ES (codón optimizado para expresión en Yarrowia)	Sintéticamente derivado de E. gracilis EgDHAsyn1	183	184 (idéntico a ID de SEC Nº:202)
Dominio de elongasa C20 EaC20 ES (codón optimizado para expresión en Yarrowia)	Sintéticamente derivado de E. anabaena EaDHAsyn2	188	189 (idéntico a ID de SEC Nº:232)

Se divulga un polinucleótido aislado que codifica una elongasa C20 que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de elongasa C20, en la que el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basada en el procedimiento Clustal V de alineamiento, cuando se compara con una secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, la ID de SEC Nº: 97; la ID de SEC Nº: 202, la ID de SEC Nº: 204, la ID de SEC Nº: 231, la ID de SEC Nº: 232, o la ID de SEC Nº: 233;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de elongasa C20 en la que la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento BLASTN de alineamiento, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, la ID de SEC Nº: 183, la ID de SEC Nº: 188, la ID de SEC Nº: 201, la ID de SEC Nº: 206, la ID de SEC Nº: 203, la ID de SEC Nº: 227, la ID de SEC Nº: 228, la ID de SEC Nº: 229, o la ID de SEC Nº: 230;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una actividad de elongasa C20, en la que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, la ID de SEC Nº: 183, la ID de SEC Nº: 188, la ID de SEC Nº: 201, la ID de SEC Nº: 206, la ID de SEC Nº: 203, la ID de SEC Nº: 227, la ID de SEC Nº: 228, la ID de SEC Nº: 229 y la ID de SEC Nº: 230; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos consisten en el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

Un polinucleótido aislado que codifica una elongasa C20 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de las ID de SEC Nº: 183, la ID de SEC Nº: 188, la ID de SEC Nº: 201, la ID de SEC Nº: 206, la ID de SEC Nº: 203, la ID de SEC Nº: 227, la ID de SEC Nº: 228, la ID de SEC Nº: 229, o la ID de SEC Nº: 230.

Identificación de secuencias de nuevas desaturasa s delta-4

Las secuencias de nucleótidos que codifican desaturasa s delta-4 se han aislado de Euglena gracilis y Euglena anabaena, tal como se resume a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

Sumario de Desaturasas Delta-4 Euglena			
Designación* de Desaturasa Delta-4	Organismo	ID de SEC de Nucleótido Nº	ID de SEC de Aminoácido Nº
Dominio 1 de delta-4 desaturasa EgDHAsyn1	E. gracilis	214	215
Dominio 1* de delta-4 desaturasa EgDHAsyn1	Sintéticamente derivado de E. gracilis EgDHAsyn1	216	217
Dominio 2 de delta-4 desaturasa EgDHAsyn1*	E. gracilis	220	221
Dominio 1 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn1	E. anabaena	236	239
Dominio 1 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn2	E. anabaena	237	240
Dominio 1 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn4	E. anabaena	238	241
Dominio 2 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn1	E. anabaena	242	246
Dominio 2 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn2	E. anabaena	243	247
Dominio 2 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn3	E. anabaena	244	248
Dominio 2 de delta-4 desaturasa EaDHAsyn4	E. anabaena	245	249
EaD4S Dominio de delta-4 desaturasa (codón optimizado para expresión en Yarrowia)	Sintéticamente derivado de E. anabaena EaDHAsyn2	192	193
EgD4S Dominio de delta-4 desaturasa (codón optimizado para expresión en Yarrowia)	Sintéticamente derivado de E. gracilis EgDHAsyn1	387	388
*Nota: El dominio 1 de delta-4 desaturasa no incluye el enlazador rico en prolina de la sintasa del DHA de la que se deriva. Por el contrario, el dominio 2 de delta-4 desaturasa incluye el enlazador rico en prolina de la sintasa del DHA de la que se deriva.			

Las presentes secuencias de dominio delta-4 desaturasa pueden ser de codón optimizado para expresión en un organismo anfitrión particular. Por ejemplo, el dominio delta-4 desaturasa Euglena anabaena EaDHAsyn2 era codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica. Por ejemplo, el dominio delta-4 desaturasa Euglena gracilis de EgDHAsyn1 era también codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica. Un experto en la técnica sería capaz de utilizar las enseñanzas del presente documento para crear otras diversas proteínas delta-4 desaturasa de codón optimizado adecuadas para una óptima expresión en anfitriones alternativos, basados en las secuencias de dominio delta-4 desaturasa de tipo silvestre de EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y/o EaDHAsyn3 como se describe anteriormente en la Tabla 6. En consecuencia, una proteína de codón optimizado delta-4 desaturasa puede derivarse de una secuencia de tipo silvestre descrita en el presente documento. Puede ser deseable modificar una porción de los codones que codifican las secuencias del dominio delta-4 desaturasa de EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1 , EaDHAsyn2 y/o EaDHAsyn3 para mejorar la expresión del gen en un organismo anfitrión incluyendo, pero sin limitarse a una planta o parte de una planta.

Además, basado en la observación de que la porción C-término del dominio elongasa C20 de las sintasas del DHA parece superponerse con la porción N-término del dominio delta-4 desaturasa, se llevaron a cabo análisis funcionales para definir el dominio funcional óptimo de la delta-4 desaturasa. Como se describe en los Ejemplos 51 y 53 en lo sucesivo, se realizaron estudios de mutagénesis por eliminación utilizando las secuencias de proteínas con

optimizado con codón, EaD4S (la ID de SEC Nº: 193) y EgD4S y (la ID de SEC Nº: 388). Se produjeron las siguientes variantes: EaD4S-3 (la ID de SEC Nº: 386), EaD4S-2 (la ID de SEC Nº: 384), EaD4S-1 (la ID de SEC Nº: 382), EgD4S-3 (la ID de SEC Nº: 408), EgD4S-2 (la ID de SEC Nº: 406) y EgD4S-1 (la ID de SEC Nº: 404).

Un experto en la técnica reconocerá que, dado que los Límites exactos de estas secuencias particulares de delta-4 desaturasa de Euglena gracilis y Euglena anabaena no se han definido completamente, fragmentos de proteínas o polipéptidos de longitudes aumentadas o disminuidas pueden tener una actividad delta-4 desaturasa comparable. De forma similar, podría n realizarse fácilmente truncamientos comparables basadas en secuencias de dominio delta-4 desaturasa de tipo silvestre de EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y/o EaDHAsyn3 como se describe anteriormente en la Tabla 6, para producir una cantidad de delta-4 desaturasa que tiene una actividad delta-4 desaturasa suficiente, en donde se preferiría una actividad delta-4 desaturasa equivalente o aumentada.

Así, en el presente documento se describe un polinucleótido aislado que codifica una delta-4 desaturasa que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-4 desaturasa, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento Clustal V de alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se establece en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, la ID de SEC Nº: 97, la ID de SEC Nº: 215, la ID de SEC Nº: 217, la ID de SEC Nº: 221, la ID de SEC Nº: 239, la ID de SEC Nº: 240, la ID de SEC Nº: 241, la ID de SEC Nº: 246, la ID de SEC Nº: 247, la ID de SEC Nº: 248, la ID de SEC Nº: 249, la ID de SEC Nº: 193, la ID de SEC Nº: 382, la ID de SEC Nº: 384, la ID de SEC Nº: 386, la ID de SEC Nº: 388, la ID de SEC Nº: 404, la ID de SEC Nº: 406, o la ID de SEC Nº: 408;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-4 desaturasa en donde la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento BLASTN de alineamiento, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se establece en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, la ID de SEC Nº: 214, la ID de SEC Nº: 216, la ID de SEC Nº: 220, la ID de SEC Nº: 236, la ID de SEC Nº: 237, la ID de SEC Nº: 238, la ID de SEC Nº: 242, la ID de SEC Nº: 243, la ID de SEC Nº: 244, la ID de SEC Nº: 245, la ID de SEC Nº: 192, la ID de SEC Nº: 381, la ID de SEC Nº: 383, la ID de SEC Nº: 385, la ID de SEC Nº: 387, la ID de SEC Nº: 403, la ID de SEC Nº: 405 o la ID de SEC Nº: 407;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-4 desaturasa, donde la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se establece en la ID de SEC Nº: 11, la ID de SEC Nº: 21, la ID de SEC Nº: 91, la ID de SEC Nº: 92, la ID de SEC Nº: 93, la ID de SEC Nº: 214, la ID de SEC Nº: 216, la ID de SEC Nº: 220, la ID de SEC Nº: 236, la ID de SEC Nº: 237, la ID de SEC Nº: 238, la ID de SEC Nº: 242, la ID de SEC Nº: 243, la ID de SEC Nº: 244, la ID de SEC Nº: 245, la ID de SEC Nº: 192, la ID de SEC Nº: 381, la ID de SEC Nº: 383, la ID de SEC Nº: 385, la ID de SEC Nº: 387, la ID de SEC Nº: 403, la ID de SEC Nº: 405 o la ID de SEC Nº: 407; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos consisten en el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

Un polinucleótido aislado que codifica una delta-4 desaturasa puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de la ID de SEC Nº: 214, la ID de SEC Nº: 220, la ID de SEC Nº: 236, la ID de SEC Nº: 237, la ID de SEC Nº: 238, la ID de SEC Nº: 242, la ID de SEC Nº: 243, la ID de SEC Nº: 244, la ID de SEC Nº: 245, la ID de SEC Nº: 192, la ID de SEC Nº: 381, la ID de SEC Nº: 383, la ID de SEC Nº: 385, la ID de SEC Nº: 387, la ID de SEC Nº: 403, la ID de SEC Nº: 405, o la ID de SEC Nº: 407.

El efecto de truncar la delta-4 desaturasa Euglena anabaena es que aumenta la actividad enzimática en comparación con la actividad enzimática de la secuencia de tipo silvestre. Este resultado es inesperado e imprevisible, ya que un experto normal e la técnica esperaría que la actividad de una secuencia truncada fuera no mejor y posiblemente menos activa que la secuencia de tipo silvestre. En consecuencia, en el presente documento se describe un procedimiento para obtener una delta-4 desaturasa que tenga mayor actividad que la secuencia de tipo silvestre, que comprende el procedimiento: a) proporcionar un polipéptido delta-4 desaturasa de tipo silvestre aislado de Euglena Anabena que tiene una actividad delta-4 desaturasa de línea de base; y b) truncar el polipéptido de tipo silvestre de (a) en aproximadamente 1 a aproximadamente 200 aminoácidos (a) para crear un polipéptido mutante truncado que tenga actividad delta-4 desaturasa que se incremente en comparación con la actividad de la delta-4 desaturasa de la línea de base. Actividad "línea base" tal como se utiliza en este contexto se define como la actividad de la enzima de tipo silvestre medida bien in vivo o bien in vitro según protocolos enzimáticos estándares como se describen en el presente documento.

Cualquiera de las enzimas (por ejemplo, multienzimas, sintasas del DHA, elongasas C20 , delta-4 desaturasas, y/o cualquiera de sus homólogos) identificadas en el presente documento pueden ser modificadas para generar nuevas y/o mejoradas enzimas de la vía biosintética de los PUFA. Como es bien conocido por los expertos en la técnica, la mutagénesis y selección in vitro, la mutagénesis química, los procedimientos de "transposición de genes" u otros

medios pueden emplearse para obtener mutaciones de genes de origen natural. Alternativamente, pueden sintetizarse multienzimas mediante intercambio de dominios, en donde un dominio funcional de cualquier enzima puede ser intercambiado con o añadirse a un dominio funcional en una enzima alternativa para dar como resultado de ese modo una nueva proteína.

Procedimientos para la producción de diversos ácidos grasos omega-3 y/o omega-6

Se espera que la introducción de genes quiméricos que codifican las sintasas del DHA descritos en el presente documento (es decir, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3 u otras enzimas mutantes, enzimas con de codón optimizado o sus homólogos), bajo el control de los promotores apropiados darán como resultado un aumento de la producción de DTA, DPAn-6, DPA y/o DHA en el organismo anfitrión transformado, respectivamente. Como tal, en el presente documento se describe un procedimiento para la producción directa de los PUFA que comprende exponer un sustrato de ácido graso (es decir, EPA o DPA) a las enzimas sintasa del DHA descritas en el presente documento (por ejemplo, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3), tal que el sustrato se transforma en el producto de ácido graso deseado (es decir, DHA).

Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para transformar una célula anfitriona tal que la célula anfitriona comprende en su genoma un constructo recombinante de la invención.

Ejemplos de células anfitrión adecuadas incluyen, pero no se limitan a plantas y levaduras. Preferiblemente, las células vegetales se obtienen a partir de una planta de semillas oleaginosas tal como soja y similares y las células de levadura se obtienen a partir de levadura oleaginosa tal como Yarrowia sp.

Esta invención proporciona también un procedimiento para producir una planta o levadura transformada que comprende transformar una célula vegetal o una célula de levadura con un constructor recombinante de la invención y regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada o cultivar las células de levadura transformadas.

Más específicamente, en el presente documento se describe un procedimiento para la producción de DPAn-6 o DHA en una célula anfitriona (por ejemplo, plantas, levadura oleaginosa), en donde la célula anfitriona comprende:

(i) una molécula de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad sintasa del DHA, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basada en el procedimiento Clustal V de alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se establece en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, o la ID de SEC Nº: 97; y

(ii) una fuente de ARA o EPA;

en donde la célula anfitriona se cultiva en condiciones tales que el polipéptido que tiene actividad de sintasa del DHA se expresa y el ARA se transforma en DPAn-6 y/o el EPA se transforma en DHA, y en donde el DPAn-6 o DHA es, opcionalmente, recuperada.

En el presente documento, también se describe un procedimiento para la producción de DTA o DPA en una célula anfitriona (p. ej., plantas, levadura oleaginosa), en donde la célula anfitriona comprende:

(i) una molécula de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad de elongasa C20, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basada en el procedimiento Clustal V de alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se establece en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, la ID de SEC Nº: 97, la ID de SEC Nº: 202, la ID de SEC Nº: 204, SEQ ID Nº: 231, la ID de SEC Nº: 232 o la ID de SEC Nº: 233; y

(ii) una fuente de ARA o EPA;

en donde la célula anfitriona se cultiva en condiciones tales que el polipéptido que tiene actividad elongasa C20 se expresa y el ARA se transforma en DTA y/o la EPA se transforma en DPA, y en donde DTA o DPA es, opcionalmente, recuperada.

Además, en el presente documento se describe un procedimiento para la producción de DPAn-6 o DHA, en donde la célula anfitriona comprende:

(i) una molécula de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido que tiene actividad de delta-4 desaturasa, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basada en el procedimiento Clustal V de alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se establece en la ID de SEC Nº: 12, la ID de SEC Nº: 22, la ID de SEC Nº: 95, la ID de SEC Nº: 96, la ID de SEC Nº: 97, la ID de SEC Nº: 215, la ID de SEC Nº: 221, la ID de SEC Nº: 239, la ID de SEC Nº: 240, la ID de SEC Nº: 241, la ID de SEC Nº: 246, la ID de SEC Nº: 247, la ID de SEC Nº: 248, la ID de SEC Nº: 249, la ID de SEC Nº: 382, la ID de SEC Nº: 384, la ID de SEC Nº: 386, la ID de SEC Nº: 388, la ID de SEC Nº: 404, la ID de SEC Nº: 406, o la ID de SEC Nº: 408; y,

(ii) una fuente de DTA o DPA;

en donde la célula anfitriona se cultiva en condiciones tales el polipéptido que tiene actividad delta-4 desaturasa se expresa y la DTA se transforma en DPAn-6 y/o el DPA se transforma en DHA, y en donde el DPAn-6 o DHA es, opcionalmente, recuperado.

La fuente del sustrato (o sustratos) ARA, DTA, EPA o DPA utilizados en cualquiera de los procedimientos anteriores puede ser producida por la anfitriona bien de forma natural o transgénicamente, o puede ser proporcionado de forma exógena.

Enlazar dominios individuales para formar una multienzima podría conducir a una disminución de los ácidos grasos intermedios. Por ejemplo, enlazar una elongasa C20 con una delta-4 desaturasa en una multienzima, tal como sintasa del DHA, puede conducir a una disminución en el ácido graso intermedio DPA durante la producción de DHA. De forma similar, el enlace de una delta-9 elongasa a una delta-8 desaturasa utilizando el enlazador EgDHAsyn1 para formar una multienzima como se describe en el presente documento puede conducir a la producción de DGLA y ETA con una disminución en los intermedios EDA y ERA.

Alternativamente, cada gen multienzima que incluye sintasa del DHA y sus productos enzimáticos correspondiente descritos en el presente documento se pueden utilizar indirectamente para la producción de diversos PUFA de ácidos grasos omega-6 y omega-3 que incluye, p. ej., DTA, DPAn-6, DGLA, ETA, ARA, EPA, DPA y/o DHA (FIG. 1; véase la patente de EE.UU. 7.238.482). La producción indirecta de PUFA de omega-3/omega-6 se producen en donde el sustrato de ácido graso se transforma indirectamente en el producto de ácido graso deseado, a través de medios de un paso (o pasos) intermedio o vía (o vías) intermedia. Así, se contempla que las sintasas de DHA descritas en el presente documento (es decir, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3, u otras enzimas mutantes, enzimas con de codón optimizado o sus homólogos) se pueden expresar junto con genes adicionales que codifican enzimas de la ruta biosintética de los PUFA (p. ej., delta-6 desaturasas, elongasas $C_{18/20}$, delta-17 desaturasas, delta-8 desaturasas, delta-15 desaturasas, delta-9 desaturasas, delta-12 desaturasas, elongasas $C_{14/16}$, elongasas $C_{16/18}$, delta-9 elongasas, delta-5 desaturasas, delta-4 desaturasas, elongasas C20/22, sintasas de DHA) para dar como resultado mayores niveles de producción de ácidos grasos omega-3/omega-6 de cadena larga (p. ej., ARA, DTA, DPAn-6, EPA, DPA y/o DHA).

Los genes específicos incluidos dentro de una casete de expresión particular, dependerán de la célula anfitriona (y su perfil de los PUFA y/o perfil de desaturasa/elongasa), la disponibilidad del sustrato y el producto (o productos) final deseado.

A veces, puede ser deseable reducir al mínimo los ácidos grasos subproductos. La abundancia relativa de ácidos grasos subproductos podría disminuirse enlazando enzimas de la ruta individuales junto con un enlazador para formar una multienzima. Por ejemplo, la presencia de ácido esciadónico (SCI) y/o ácido juniperónico (JUP) [encontrado normalmente en los lípidos de las semillas de gimnospermas (Wolff et al., Lipids 35(1): 1-22 (2000)), tales como los de la familia Pinaceae (pino)] podrían considerarse ácidos grasos subproductos de una vía delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa o una vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa. Aunque se considera que estos ácidos grasos tienen varias propiedades en sí mismos que mejoran la salud (Nakane et al., Biol. Pharm. Bull. 23: 758-761 (2000)), su presencia como ácidos grasos subproductos en una vía diseñada de los PUFA, tal como en un cultivo de semillas oleaginosas, puede que no sea deseable depender de la aplicación. El enlace de una delta-9 elongasa junto con una delta-8 desaturasa utilizando un enlazador para formar una multienzima (sintasa de DGLA y/o ETA), por ejemplo, resultado podría dar como resultado un aumento del flujo a través de estos pasos para conducir a una menor disponibilidad de los ácidos grasos intermedios EDA/ERA para delta-5 desaturasa, y por ello menores concentraciones de SCI y JUP.

Ocasionalmente, una delta-6 elongasa puede alargar ácidos grasos distintos de los ácidos grasos previstos. Por ejemplo, las delta-6 elongasas generalmente convierten GLA en DGLA pero algunos delta-6 elongasas pueden también transformar sustratos no deseados, tal como LA o ALA en EDA o ETrA, respectivamente. En un vía delta-6 desaturasa/delta 6 elongasa, EDA y ETrA se considerarían "ácidos grasos subproductos". La adición de una delta-8 desaturasa a una vía delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa puede proporcionar un medio para transformar los "ácidos grasos subproductos" EDA y ETrA de nuevo en "ácidos grasos intermedios" DGLA y ETA, respectivamente.

Puede ser útil interrumpir una sintasa de DHA nativa del organismo anfitrión, elongasa C20, o delta-4 desaturasa, basada en las secuencias completas descritas en el presente documento, el complemento de aquellas secuencias completas, porciones sustanciales de aquellas secuencias, desaturasas con de codón optimizado derivadas de las mismas, y aquellas secuencias que son sustancialmente homólogas a la misma.

Sistemas, casetes y vectores de expresión de plantas, y transformación

En una realización, esta invención se refiere a un constructo recombinante que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos aislados que codifican la multienzima de la invención unido de forma operable a al menos una secuencia reguladora adecuada para expresión en una célula anfitriona tal como una planta. Un promotor es una secuencia de ADN que dirige la maquinaria celular de una planta para producir ARN a partir de la secuencia de codificación contigua secuencia abajo (3') del promotor. La región del promotor influye en la velocidad, etapa de desarrollo, y tipo de célula en la que se realiza el transcrito de ARN del gen. El transcrito de ARN se procesa para

producir ARNm, que sirve como un molde para la traducción de la secuencia de ARN en la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. La secuencia líder no traducida 5' es una región del ARNm secuencia arriba de la región codificante de la proteína que puede desempeñar un papel en el inicio y la traducción del ARNm. La señal de terminación/poliadenilación de la transcripción 3' es una región no traducida secuencia abajo de la región codificante de la proteína que funciona en la célula vegetal para provocar la terminación del transcrito de ARN y la adición de nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del ARN.

El origen del promotor elegido para dirigir la expresión de la secuencia de codificación de la multienzima no es importante, siempre que tenga suficiente actividad transcripcional para llevar a cabo la invención mediante la expresión de ARNm traducible para los fragmentos de ácido nucleico deseados en el tejido anfitrión deseado en el momento adecuado. Los promotores bien heterólogos o bien no heterólogos (es decir, endógenos) pueden utilizarse en la práctica de la invención. Por ejemplo, promotores adecuados en plantas incluyen, pero no se limitan a: la subunidad principal alfa del promotor de la beta conglicinina, el promotor inhibidor 3 de tripsina de Kunitz, el promotor de anexina, el promotor de la glicinina Gy1, la subunidad beta del promotor de la beta conglicinina, el promotor P34/Gly Bd m 30K, el promotor de la albúmina, el promotor Leg A1 y el promotor Leg A2.

El promotor de anexina, o P34, se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071178 (publicada el 26 de agosto de 2004).El nivel de actividad del promotor de anexina es comparable al de muchos promotores fuertes conocidos, tales como: (1) el promotor CaMV 35S (Atanassova et al., Plant Mol. Biol. 37: 275-285 (1998); Battraw y Hall, Plant Mol. Biol. 15: 527-538 (1990); Holtorf et al., Plant Mol. Biol. 29: 637-646 (1995); Jefferson et al., EMBO J. 6: 3901-3907 (1987); Wilmink et al., Plant Mol. Biol. 28: 949-955 (1995)); (2) los promotores de oleosina de Arabidopsis (Plant et al., Plant Mol. Biol. 25: 193-205 (1994); Li, Texas A & M University Ph.D. disertation, pág. 107-128 (1997)); (3) las promotores de proteínas de extensión de ubiquitina Arabidopsis (Callis et al., J Biol. Chem. 265 (21): 12486-93 (1990)); (4) un promotor de un gen de ubiquitina del tomate (Rollfinke et al., Gene 211 (2): 267-76 (1998)); (5) un promotor de una proteína de choque térmico de soja (Schoffl et al., Mol. Gen. Genet. 217(2-3): 246-53 (1989)); y (6) un promotor de un gen de histona H3 del maíz (Atanassova et al., Plant Mol. Biol. 37 (2): 275-85 (1989)).

Otra característica útil del promotor de anexina es su perfil de expresión en desarrollar semillas. El promotor de anexina es mas activo en desarrollar semillas en las etapas iniciales (antes de 10 días después de la polinización) y es mayormente inactivo en las etapas posteriores. El perfil de expresión del promotor de anexina es diferente del de muchos promotores específicos de semillas, p. ej., promotores de proteínas de almacenamiento de semillas, que a menudo proporcionan mayor actividad en etapas posteriores de desarrollo (Chen et al., Dev. Genet. 10: 112-122 (1989); Ellerstrom et al., Plant Mol. Biol. 32: 1019-1027 (1996); Keddie et al., Plant Mol. Biol. 24: 327-340 (1994); Plant et al., (supra); Li, (supra)). El promotor de anexina tiene un perfil de expresión más convencional, pero sigue siendo distinto de otros promotores específicos de semillas conocidos. Por ello, el promotor de anexina será un candidato muy atractivo cuando se desea la sobreexpresión, o la eliminación, de un gen en embriones en una etapa temprana de desarrollo. Por ejemplo, puede ser deseable sobreexpresar un gen que regula el desarrollo embrionario temprano o un gen implicado en el metabolismo anterior a la maduración de las semillas.

Después de la identificación de un promotor apropiado adecuado para expresión de una secuencia de codificación de sintasa específica de DHA, el promotor es entonces enlazado de forma operable en una orientación sentido utilizando medios convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

Técnicas estándares de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en el presente documento son bien conocidas en la técnica y se describen más completamente en Sambrook, J. et al., en Molecular Cloning: A Laboratory manual; 2º ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 (en adelante "Sambrook et al., 1989") o Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K., Eds; en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons: Nueva York, 1990 (en adelante "Ausubel et al., 1990"). Por ejemplo, una fusión génica puede ser construido enlazando al menos dos fragmentos de ADN en marco con el fin de no introducir un codón de parada (fusión en marco). El fusión génica resultante será tal que cada fragmento de ADN codifica durante al menos una actividad enzimática independiente y separable.

Una vez que se ha producido el constructo recombinante, puede entonces ser introducido en una célula vegetal de elección por procedimientos bien conocidos por los expertos corrientes en la técnica (por ejemplo, transfección, transformación y electroporación). Las células de semillas oleaginosas son las células vegetales preferidas. La célula vegetal transformada se cultiva a continuación y se regenera en condiciones adecuadas que permitan la expresión del PUFA de cadena larga que es, después, opcionalmente recuperado y purificado.

Los constructos recombinantes de la invención pueden ser introducidos en una célula vegetal; o, alternativamente, cada constructo puede ser introducido en células vegetales separadas.

La expresión en una célula vegetal puede llevarse un cabo de una manera transitoria o estable como se ha descrito anteriormente.

Los PUFA de cadena larga deseados pueden ser expresados en semillas. Esta invención también proporciona semillas o partes de plantas obtenidas a partir de tales plantas transformadas.

Las partes de plantas incluyen tejidos diferenciadas y no diferenciados, pero no se limitan a los siguientes: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones y tejido de callo). El tejido vegetal puede estar en la planta o en un órgano de la planta, tejido o cultivo celular.

La expresión "órgano de la planta" se refiere a tejido de la planta o a un grupo de tejidos que constituyen una parte morfológica y funcionalmente distinta de una planta. El término "genoma" se refiere a lo siguiente: (1) todo el complemento de material genético (genes y secuencias no codificantes) que está presente en cada célula de un organismo, o virus u orgánulo; y/o (2) un conjunto completo de cromosomas heredados como una unidad (haploide) de uno de los padres.

Por ello, esta invención también se refiere a un procedimiento para transformar una célula, que comprende transformar una célula con el constructo recombinante de la invención y seleccionar aquellas células transformadas con los constructos recombinantes descritos en las reivindicaciones.

También de interés es un procedimiento para producir una planta transformada que comprende transformar una célula de la planta con el constructo recombinante de la presente invención y regenerar una planta a partir de la célula de la planta transformada.

Los procedimientos para transformar dicotiledóneas (principalmente por el uso de Agrobacterium tumefaciens) y obtener plantas transgénicas se han publicado, entre otros, para: algodón (patente de EE.UU. Nº 5.004.863; patente de EE.UU. Nº 5.159.135); soja (patente de EE.UU. nº 5.569.834; patente de EE.UU. Nº 5.416.011); Brassica (patente de EE.UU. Nº 5.463.174); cacahuete (Cheng et al., Plant Cell Rep. 15: 653-657 (1996); McKently et al., Plant Cell Rep. 14: 699-703 (1995)); papaya (Ling, K. et al., Bio/Technology 9: 752-758 (1991)); y guisante (Grant et al., Plant Cell Rep. 15: 254 a 258 (1995)). Para una revisión de otros procedimientos de uso común de la transformación de plantas véase Newell, C.A. (Mol. Biotechnol. 16: 53-65 (2000)). Uno de estos procedimientos de transformación utiliza Agrobacterium rhizogenes (Tepfler, M. y Casse-Delbart, F. Microbiol Sci. 4: 24-28 (1987)). La transformación de las sojas utilizando la entrega directa de ADN se ha publicado utilizando fusión PEG (publicación PCT Nº WO 92/17598), electroporación (Chowrira, G.M. et al., Mol. Biotechnol. 3: 17-23 (1995); Christou, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84: 3962-3966 (1987)), microinyección y bombardeo de partículas (McCabe, D.E. et al., Bio/Technology 6: 923 (1988); Christou et al., Plant Physiol. 87: 671-674 (1988)).

Hay una variedad de procedimientos para la regeneración de plantas a partir de tejido de plantas. El procedimiento particular de regeneración dependerá del tejido de la planta de partida y de la particular especie de planta que se regenerará. La regeneración, desarrollo y cultivo de las plantas a partir de transformantes de protoplastos de plantas individuales o a partir de varios explantes transformados son bien conocidas en la técnica (Weissbach y Weissbach, en: Methods for Plant Molecular Biology, (Eds), Academic: San Diego, CA (1988)). Este proceso de regeneración y cultivo incluye típicamente las etapas de selección de células transformadas y el cultivo de aquellas células individualizadas a través de etapas habituales del desarrollo embrionario a través de la etapa de plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de cultivo de las plantas apropiado tal como la tierra. Preferiblemente, las plantas regeneradas son auto-polinizadas para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. De lo contrario, el polen obtenido a partir de las plantas regeneradas se cruza con las plantas de cultivo con semillas de líneas agronómicamente importantes. Por el contrario, el polen de las plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva utilizando procedimientos bien conocidos por un experto en la técnica.

Además de los procedimientos discutidos anteriormente, los técnicos están familiarizados con los recursos materiales estándares que describen condiciones y procedimientos específicos para: la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (p. ej., moléculas de ADN, plásmidos, etc); la generación de fragmentos de ADN recombinante y constructos de expresión recombinantes; y el cribado y aislamiento de clones. Véase, por ejemplo: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold, Spring Harbor: NY (1989); Maliga et al., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor: NY (1995); Birren et al., Genome Analysis: Dtecting Genes, Vol.1, Cold Spring Harbor: NY (1998); Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, Vol. 2, Cold Spring Harbor: NY (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer: NY (1997).

Los ejemplos de plantas de semillas oleaginosas incluyen, pero no se limitan a: soja, Brassica species, girasol, maíz, algodón, lino y cártamo.

Los ejemplos de PUFA que tienen al menos veinte átomos de carbono y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono incluyen, pero no se limitan a ácidos grasos omega-3 tales como EPA, DPA y DHA. Las semillas obtenidas a partir de tales plantas son también proporcionadas por esta invención. El aceite obtenido a partir de tales semillas se divulga también en el presente documento.

Por ello, la presente invención se refiere también a un procedimiento para alterar el perfil de ácidos grasos de una planta de semillas oleaginosas que comprende:

a) transformar una célula de planta de semilla oleaginosa con el constructo recombinante de la reivindicación de la invención; y

b) regenerar una planta a partir de la etapa (a) de la célula de la planta de semilla oleaginosa transformada, en donde la planta tiene un perfil de ácidos grasos alterado.

Sistemas, casetes y vectores de expresión microbianos

Los genes y productos de los genes de la sintasa DHA descritos en el presente documento (es decir, EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3, u otras enzimas mutantes, enzimas con de codón optimizado o sus homólogos) pueden también ser producidos en células anfitrionas microbianas heterólogas, particularmente en las células de levaduras oleaginosas (por ejemplo, Yarrowia lipolytica).

Los sistemas de expresión y vectores de expresión microbianos que contienen secuencias reguladoras que dirigen expresión de alto nivel de proteínas foráneas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquiera de estos podría usarse para construir genes quiméricos para la producción de cualquiera de los productos génicos de las presentes secuencias. Estos genes quiméricos podrían entonces ser introducidos en microorganismos apropiados a través de la transformación para proporcionar un alto nivel de expresión de las enzimas codificadas.

Los vectores útiles para la transformación de células anfitrionas microbianas adecuadas son bien conocidos en la técnica. La elección específica de secuencias presentes en el constructo depende de los productos de expresión deseados (supra), la naturaleza de la célula anfitriona y los medios propuestos para separar las células transformadas frente a las células no transformadas. Típicamente, sin embargo, el vector contiene al menos una casete de expresión, un etiquetador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica. Casetes de expresión adecuadas comprenden una región 5' del gen que controla la iniciación transcripcional (por ejemplo, un promotor), la secuencia que codifica el gen, y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación transcripcional (es decir, un terminador). Lo más preferido es cuando ambas regiones de control se derivan de genes de la célula anfitriona microbiana transformada, aunque se debe entender que tales regiones de control no necesitan derivarse de los genes nativos para las especies específicas escogidas como anfitrión de la producción.

Regiones o promotores de control de iniciación, que son útiles para dirigir la expresión de las presentes multienzimas, como la sintasa de DHA o los ORF de dominio individuales, en las células anfitrionas microbianas deseadas son numerosos y conocidos por los expertos en la técnica. Prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de estos genes en la célula anfitriona seleccionada es adecuado para la presente invención. La expresión en una célula anfitrionas microbiana se puede lograr de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria se puede lograr mediante la inducción de la actividad de un promotor regulable enlazado de forma operable al gen de interés. La expresión estable se puede lograr mediante el uso de un promotor constitutivo enlazado de forma operable al gen de interés. Como ejemplo, cuando la célula anfitriona es levadura, se proporcionan regiones de transcripción y de traducción funcionales en células de levadura, particularmente a partir de especies anfitrionas (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. 7.238.482 y la publicación PCT Nº WO 2006/052870 para las regiones reguladoras de iniciación transcripcional preferidas para uso en Yarrowia lipolytica). Puede usarse una cualquiera de un número de secuencias reguladoras, dependiendo de si se desea transcripción constitutiva o inducida, la eficiencia del promotor en la expresión de la ORF de interés, la facilidad de construcción y similares.

Se han encontrado secuencias de nucleótidos que rodean el "ATG" del codón de iniciación de la traducción que afectan a la expresión en células de levadura. Si el polipéptido deseado se expresa insuficientemente en levadura, las secuencias de nucleótidos de genes exógenos pueden modificarse para incluir una secuencia eficiente de iniciación de la traducción de levadura para obtener la óptima expresión génica. Para la expresión en levadura, esto puede hacerse por mutagénesis dirigida al sitio de un gen expresado ineficientemente mediante la fusión en marco con un gen de levadura endógeno, preferiblemente un gen muy expresado. Alternativamente, se puede determinar la secuencia de iniciación de la traducción consenso en la anfitriona y diseñar esta secuencia en los genes heterólogos para su óptima expresión en la anfitriona de interés.

La región de terminación puede derivarse de la región 3' del gen del que se obtuvo la región de iniciación o de un gen diferente. Un gran número de regiones de terminación son conocidas y funcionan satisfactoriamente en una variedad de anfitriones (cuando se utilizan ambos en el mismo y diferentes géneros y especies de donde se derivaron). La región de terminación normalmente se selecciona más como una cuestión de conveniencia que por cualquier propiedad particular. Regiones de control de terminación también se pueden derivar de diversos genes nativos para los anfitriones preferidos. En realizaciones alternativas, la región 3’ también puede ser sintética, como un experto en la técnica puede utilizar la información disponible para diseñar y sintetizar una secuencia de región 3' que funcione como un terminador de transcripción. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario; sin embargo, es lo más preferido si se incluye.

Como un experto en la técnica es consciente, simplemente insertar un gen en un vector de clonación no asegura que será expresado con éxito en el nivel necesario. En respuesta a la necesidad de una alta tasa de expresión,

muchos vectores de expresión especializados se han creado mediante la manipulación de un número de diferentes elementos genéticos que controlan aspectos de la transcripción, traducción, estabilidad de la proteína, limitación de oxígeno y secreción de la célula anfitriona microbiana. Más específicamente, algunas de las características moleculares que han sido manipuladas para controlar la expresión génica incluyen: la naturaleza de las pertinentes secuencias de promotores y terminadores transcripcionales; el número de copias del gen clonado; si el gen es transportado por plásmido o está integrado en el genoma de la célula anfitriona; la localización celular final de la proteína foránea sintetizada; la eficiencia de la traducción y el correcto plegamiento de la proteína en el organismo anfitrión; la estabilidad intrínseca del ARNm y de la proteína del gen clonado en la célula anfitriona; y el uso de codón en el gen clonado, de tal manera que su frecuencia se aproxima a la frecuencia de uso del codón preferido de la célula anfitriona. Cada tipo de modificación puede ser utilizado como medio para optimizar aún más la expresión de las sintasas de DHA descritas en este documento

Transformación de células anfitrionas microbianas

Una vez se ha obtenido un casete que es adecuado para expresión en una célula anfitriona apropiada (por ejemplo, un gen quimérico que comprende un promotor, el ORF y el terminador), se coloca en un vector plásmido capaz de replicación autónoma en una célula anfitriona, o es directamente integrado en el genoma de la célula anfitriona. La integración de casetes de expresión puede ocurrir aleatoriamente dentro del genoma de la anfitriona o puede ser dirigido mediante el uso de constructos que contienen regiones de homología con el genoma de la anfitriona suficiente para dirigir la recombinación en el locus anfitrión. Cuando los constructos están dirigidos a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

Cuando dos o más genes son expresados a partir de vectores de replicación separados, es deseable que cada vector tenga un medio diferente de selección y debería carecer de homología con el otro constructo (o constructos) para mantener estable la expresión e impedir la recombinación de elementos entre constructos. Elección juiciosa de regiones reguladoras, medios de selección y procedimiento de propagación del constructor (o constructos) introducido se pueden determinar experimentalmente de modo que todos los genes introducidos se expresan en los niveles necesarios para contemplar la síntesis de los productos deseados.

Los constructos que comprenden el gen (o genes) de interés pueden introducirse en una célula anfitriona microbiana mediante cualquier técnica estándar. Estas técnicas incluyen la transformación (por ejemplo, la transformación de acetato de litio [Methods in Enzymology, 194: 186-187 (1991)]), fusión de protoplastos, impacto biolístico, electroporación, microinyección, o cualquier otro procedimiento que introduce el gen (o genes) de interés en la célula anfitriona.

Por conveniencia, una célula anfitrionas que ha sido manipulada mediante cualquier procedimiento para tomar una secuencia de ADN (p. ej., un casete de expresión) se denominará como "transformado" o "recombinante" en el presente documento. La anfitriona transformada tendrá al menos una copia del constructo de expresión y puede tener dos o más, dependiendo de si el casete de expresión está integrado en el genoma o está presente en un elemento extracromosómico que tiene múltiples números de copias.

La célula anfitrionas transformada puede identificarse mediante diversas técnicas de selección, como se describe en las patentes de EE.UU. 7.238.482 y 7.259.255 y la publicación PCT Nº WO 2006/052870.

Después de la transformación, los sustratos adecuados para las presentes sintasas de DHA (y, opcionalmente otras enzimas PUFA que se coexpresan en la célula anfitriona) pueden ser producidas por la anfitriona bien naturalmente o bien transgénicamente, o pueden ser proporcionadas exógenamente.

Anfitrionas microbianas preferidas para expresión recombinante

Células anfitrionas microbianas para expresión de los presentes genes y fragmentos de ácido nucleico pueden incluir anfitrionas que crecen en una variedad de materias primas, incluyendo hidratos de carbono simples o complejos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, aceites y alcoholes, y/o hidrocarburos a lo largo de una amplia gama de temperaturas y valores de pH. Basado en las necesidades del Cesionario de los Solicitantes, los genes descritos en el presente documento se expresarán en una levadura oleaginosa (y en particular Yarrowia lipolytica); sin embargo, se contempla que debido a que la transcripción, la traducción y el aparato biosintético de proteínas están altamente conservadas, cualquier bacteria, levadura, algas, euglenoide y/u hongos será una anfitriona microbiana adecuada para expresión de los presentes fragmentos de ácido nucleico.

Las anfitrionas microbianas preferidas, sin embargo, son organismos oleaginosos, tales como las levaduras oleaginosas. Estos organismos son naturalmente capaces de la síntesis de aceite y la acumulación, en donde el aceite puede comprender más de aproximadamente 25% del peso seco celular, más preferiblemente mayor que aproximadamente 30% del peso seco celular, y lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 40% de la peso seco celular. Los géneros típicamente identificados como levadura oleaginosa incluyen, pero no se limitan a: Yarrowia, Candida, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus, Trichosporon y Lipomyces. Más específicamente, levaduras sintetizadoras de aceite ilustrativas incluyen: Rhodosporidium toruloides, Lipomyces starkeyii, L. lipoferus,

Candida revkaufi, C. pulcherrima, C. tropicalis, C. utilis, Trichosporon pullans, T. cutaneum, Rhodororula glutinus, R. graminis, y Yarrowia lipolytica (anteriormente clasificada como Candida lipolyfica).

La más preferida es la levadura oleaginosa Yarrowia lipolytica; y, en una realización adicional, las más preferidas son las cepas de Y. lipolytica designadas como ATCC #20362, ATCC #8862, ATCC #18944, ATCC #76982 y/o LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., y Aggelis G., Bioresour. Technol. 82(1): 43-9 (2002)).

Históricamente, varias cepas de Y. lipolytica se han utilizado para la fabricación y producción de: isocitrato liasa; lipasas; polihidroxialcanoatos; ácido cítrico; eritritol; ácido 2-oxoglutárico; gamma-decalactona; gamma-dodecalatona; y ácido pirúvico. Enseñanzas específicas aplicables a la transformación de levaduras oleaginosas (es decir, Yarrowia lipolytica) incluyen la patente de EE.UU. 4.880.741 y la patente de EE.UU. 5.071.764 y Chen, D.C. et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2): 232-235 (1997)). Enseñanzas específicas aplicables para diseñar la producción de ARA, EPA y DHA en Y. lipolytica se proporcionan en la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0094092 (publicación PCT Nº WO 2006/055322), la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881 (publicación PCT Nº WO 2006/052870) y la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0110806 (publicación PCT Nº WO 2006/052871), respectivamente.

Medios detallados para la síntesis y la transformación de los vectores de expresión que comprenden elongasas C20 y delta-4 desaturasas en levadura oleaginosa (es decir, Yarrowia lipolytica) se proporcionan en la publicación PCT Nº WO 2006/052871. El procedimiento preferido de expresar genes en Yarrowia lipolytica es mediante la integración de ADN lineal en el genoma de la anfitriona. La integración en múltiples lugares dentro del genoma puede ser particularmente útil cuando se desea expresión de alto nivel de genes [p. ej., en el locus Ura3 (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen Leu2 (Nº AF260230 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen Lys5 (Nº M34929 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen ACO2 (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen POX3 (POX3: Nº XP_503244 de acceso al Banco de Genes; o Aco3: Nº AJ001301 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen delta-12 desaturasa (patente de EE.UU. 7214491), el locus del gen Lip1 (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes), el locus del gen Lip2 (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes) y/o el locus del gen Pex10 (Nº CAG81606 de acceso al Banco de Genes)].

Regiones de terminación útiles en la descripción del presente documento para vectores de expresión Yarrowia incluyen, por ejemplo: ~ 100 pb de la región 3' de la proteasa extracelular Yarrowia lipolytica (XPR; Nº M17741 de acceso al Banco de Genes); los terminadores acil-CoA oxidasa (Aco3: Nº AJ001301 y Nº CAA04661 de acceso al Banco de Genes; POX3: Nº XP_503244 de acceso al Banco de Genes); el terminador Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes); el terminador Pex16 (Nº U75433 de acceso al Banco de Genes); el terminador Lip1 (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes); el terminador Lip2 (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes); y el terminador 3-oxoacyl-CoA tiolasa (OCT; Nº X69988 de acceso al Banco de Genes).

Los procedimientos de selección preferidos para uso en Yarrowia lipolytica son la resistencia a la kanamicina, higromicina, y el aminoglicósido G418, así como la capacidad de crecer en medio que carece de uracilo, leucina, lisina, triptófano o histidina. En realizaciones alternativas, se utiliza el ácido 5-fluoroorótico (monohidrato del ácido 5-fluorouracil-6-carboxílico; "5-FOA") para la selección de mutantes Ura- de levadura. El compuesto es tóxico para las células de levadura que poseen un gen funcionamiento URA3 que codifica orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa); así, en basado en esta toxicidad, 5-FOA es especialmente útil para la selección e identificación de cepas de levadura mutante Ura- (Bartel, P.L. y Fields, S., Yeast 2-hybrid System, Universidad de Oxford: Nueva York, v. 7, pág. 109-147, 1997; véase también la publicación PCT Nº WO 2006/052870 para usar 5-FOA en Yarrowia). Más específicamente, primero se puede desactivar el gen nativo Ura3 para producir una cepa que tenga un fenotipo Ura-, en donde se produce la selección basada en la resistencia a 5-FOA. Entonces, un grupo de múltiples genes quiméricos y un nuevo gen Ura3 pueden ser integrados en un locus diferente del genoma Yarrowia para producir una nueva cepa que tenga un fenotipo Ura+. La posterior integración produce una nueva cepa Ura3 (de nuevo identificada utilizando la selección 5-FOA), cuando el gen URA3 introducido es desactivado. Así, el gen Ura3 (en combinación con la selección de 5-FOA) se puede utilizar como un etiquetador de selección en múltiples rondas de transformación, permitiendo de este modo fácilmente las modificaciones genéticas para ser integrado en el genoma de Yarrowia de una manera fácil.

Otras anfitrionas microbianas preferidas incluyen bacterias, algas, euglenoides, y otros hongos oleaginosos; y, dentro de este amplio grupo de anfitrionas microbianas, de particular interés son los microorganismos que sintetizan ácidos grasos omega-3/omega-6 (o aquellos que pueden ser manipulados genéticamente para este propósito [p. ej., otras levaduras tales como Saccharomyces cerevisiae]). Así, por ejemplo, la transformación de Mortierella alpina (que se utiliza comercialmente para la producción de ARA) con cualquiera de los presentes genes sintasa DHA bajo el control de promotores inducibles o regulados podría producir un organismo transformante capaz de sintetizar mayores cantidades de PUFA. El procedimiento de transformación de M. alpina es descrito por Mackenzie et al. (Appl. Environ. Microbiol., 66: 4655 (2000)). Del mismo modo, los procedimientos para la transformación de microorganismos Thraustochytriales se describen en el documento US 7.001.772.

La alimentación de sustrato puede ser requerida.

Independientemente de la anfitriona seleccionada para expresión de las multienzimas (por ejemplo, sintasas DHA), múltiples transformantes deben ser cribados con el fin de obtener una cepa que presente el nivel y modelo de expresión deseado. Dicho cribado puede realizarse por análisis Southern de las transferencias de ADN (Southern, J. Mol. Biol., 98: 503 (1975)), análisis Northern de la expresión de ARNm (Kroczek, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 618(1-2): 133-145 (1993)), Western y/o análisis Elisa de expresión de la proteína, análisis fenotípico, o análisis GC de los productos PUFA.

Por supuesto, dado que los PUFA producidos de forma natural en la levadura oleaginosa se limitan a ácidos grasos 18:2 (es decir, LA), y con menos frecuencia, ácidos grasos 18:3 (es decir, ALA), en realizaciones más preferidas de la presente invención, la levadura oleaginosa se diseñará genéticamente para expresar múltiples enzimas necesarias para la biosíntesis de PUFA de cadena larga (permitiendo de este modo la producción de, p. ej., ARA, EPA, DPA y DHA), además de las multienzimas descritas en este documento.

En realizaciones particularmente preferidas, el al menos un constructo de ADN recombinante adicional codifica una sintasa de DGLA, de manera que la multienzima tiene actividad tanto delta-9 elongasa como delta-8 desaturasa. En algunas realizaciones, la delta-9 elongasa se puede aislar o derivar de Isochrysis galbana (Nº AF390174 de acceso al Banco de Genes; IgD9e o IgD9eS) o la delta-9 elongasa se puede aislar o derivar de Euglena gracilis o Euglena anabaena. Por ejemplo, véanse las sintasas DGLA expuestas como ID de SEC Nº: 441, ID de SEC Nº: 447, ID de SEC Nº: 454, ID de SEC Nº: 461, ID de SEC Nº: 464 e ID de SEC Nº: 471.

Ingeniería metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 en microbios

Los procedimientos para la manipulación de las vías bioquímicas son bien conocidos por los expertos en la técnica; y, se espera que numerosas manipulaciones serán posible para maximizar la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 en levaduras oleaginosas, y en particular, en Yarrowia lipolytica. Esta manipulación puede requerir la ingeniería metabólica directamente dentro de la vía de biosíntesis de los PUFA o manipulación adicional de las vías que aportan carbono a la vía biosintética de los PUFA. Procedimientos útiles para una regulación en aumento de las vías bioquímicas deseables y una regulación reductora de las vías bioquímicas indeseables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, las vías bioquímicas que compiten con las vías de biosíntesis de los ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 por energía o carbono, o las enzimas nativas de las vías de biosíntesis de los PUFA que interfieren con la producción de un producto final PUFA en particular, pueden ser eliminadas por disrupción génica o regulación reductora por otros medios (por ejemplo, ARNm antisentido).

La discusión detallada de las manipulaciones dentro de la vía de biosíntesis de los PUFA como un medio para aumentar ARA, EPA o DHA (y las técnicas asociadas de los mismos) se presentan en la publicación PCT Nº WO 2006/055322 [Publicación de patente de EE.UU. Nº 2006-0094092-A1], la publicación PCT Nº WO 2006/052870 [Publicación de patente de EE.UU. Nº 2006-0115881-A1] y en la publicación PCT Nº WO 2006/052871 [Publicación de patente de EE.UU. Nº 2006-0110806-A1], respectivamente, como son las manipulaciones deseables en la vía de biosíntesis de TAG y la vía de degradación TAG (y las técnicas asociadas de los mismos).

En el contexto de la presente invención, puede ser útil modular la expresión de la vía de biosíntesis de ácidos grasos mediante una cualquiera de las estrategias descritas anteriormente. Por ejemplo, la presente invención proporciona procedimientos mediante los cuales los genes que codifican enzimas clave en la vía biosintética de los PUFA se introducen en levaduras oleaginosas para la producción de ácidos grasos omega-3 y/o omega-6. Será particularmente útil expresar los genes presentes sintasa de DHA en levaduras oleaginosas que no poseen de forma natural vías de biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 y coordinar la expresión de estos genes, para maximizar la producción de productos PUFA preferidos utilizando diversos medios para la ingeniería metabólica del organismo anfitrión.

Procesos de fermentación microbiana para la producción de PUFA

La célula anfitriona transformada se cultiva en condiciones que optimizan la expresión de genes quiméricos y producen la mayor y más económica producción de PUFA deseados. En general, las condiciones del medio que pueden ser optimizadas incluyen el tipo y la cantidad de la fuente de carbono, el tipo y la cantidad de la fuente de nitrógeno, la relación carbono-nitrógeno, la cantidad de diferentes iones minerales, el nivel de oxígeno, la temperatura de cutlivo, el pH, la duración de la fase de producción de biomasa, la duración de la fase de acumulación de aceite y el tiempo y el procedimiento de recolección de células. Yarrowia lipolytica se cultivan generalmente en medios complejos (p. ej., caldo de cultivo de extracto-peptona-dextrosa de levadura (YPD)) o un medio mínimo definido que carece de un componente necesario para el cultivo y con ello fuerza a la selección de los casetes de expresión deseados (p. ej., Base Nitrogenada de Levadura (DIFCO Laboratories, Detroit, MI)).

Los medios de fermentación deben contener una fuente de carbono adecuada. Las fuentes de carbono adecuadas se enseñan en la patente de EE.UU. 7.238.482. Aunque se contempla que la fuente de carbono utilizada puede abarcar una amplia variedad de fuentes que contienen carbono, las fuentes de carbono preferidas son azúcares, glicerol y/o ácidos grasos. Lo más preferido es glucosa y ácidos/o grasos que contengan entre 10-22 átomos de carbono.

El nitrógeno puede ser suministrado desde una fuente inorgánica (p. ej., (NH4)2SO4) u orgánica (p. ej., urea o glutamato). Además de las fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno, los medios de fermentación deben contener también minerales, sales, cofactores, tampones, vitaminas y otros componentes adecuados conocidos por los expertos en la técnica adecuados para el cultivo del anfitriona oleaginosa y la promoción de las vías enzimáticas necesarias para la producción de PUFA. Se presta especial atención a varios iones metálicos (p. ej., Fe+2, Cu+2, Mn+2, Co+2, Zn+2 y Mg+2) que promueven la síntesis de lípidos y PUFA (Nakahara, T. et al., Ind. Appl. Single Cell Oils, D.J. Kyle y R. Colin, eds. pág. 61-97 (1992)).

Medios de cultivo preferidos son los medios corrientes preparados comercialmente, tal como Base Nitrogenada de Levadura (DIFCO Laboratories, Detroit, MI). También pueden utilizarse otros medios de cultivo definidos o sintéticos y el medio apropiado para el cultivo de las células anfitrionas transformantes serán conocidos por el experto en la técnica de la microbiología o ciencia de fermentación. Un intervalo de pH adecuado para la fermentación es típicamente entre aproximadamente pH 4,0 y pH 8,0, en donde pH 5,5 a pH 7,5 se prefiere como el intervalo para las condiciones de cultivo iniciales. La fermentación puede llevarse a cabo en condiciones aerobias o anaerobias, en donde se prefieren las condiciones microaerobias.

Típicamente, la acumulación de altos niveles de PUFA en células de levadura oleaginosas requiere un proceso en dos etapas, ya que el estado metabólico debe ser "equilibrado" entre el cultivo y la síntesis/almacenamiento de las grasas. Por ello, lo más preferiblemente, un proceso de fermentación en dos etapas es necesaria para la producción de PUFA en la levadura oleaginosa (p. ej., Yarrowia lipolytica). Este enfoque se describe en la patente de EE.UU. 7.238.482, como son varios diseños de procesos de fermentación adecuados (es decir, por lotes, por lotes alimentados y en continuo) y consideraciones durante el cultivo.

Purificación y procesamiento de aceites de PUFA

Los PUFA se pueden encontrar en los microorganismos y plantas anfitrionas como ácidos grasos libres o en forma de esterificada tal como acilgliceroles, fosfolípidos, sulfolípidos o glicolípidos, y pueden ser extraídos de las células anfitrionas a través de una variedad de medios bien conocidos en la técnica. Una revisión de las técnicas de extracción, análisis de la calidad y normas de aceptabilidad para los lípidos de levadura es la de Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology, 12(5/6): 463-491 (1992)). Una breve revisión del procesamiento secuencia abajo está también disponible por A. Singh y O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45: 271-312 (1997)).

En general, los medios para la purificación de PUFA puede incluir la extracción (p. ej., patente de EE.UU. 6.797.303 y patente de EE.UU. 5.648.564) con disolvente orgánico, la sonicación, la extracción de fluido supercrítico (por ejemplo, utilizando dióxido de carbono), saponificación y medios físicos tales como las prensas, o combinaciones de los mismos. Uno se refiere a las enseñanzas de la patente de EE.UU. 7.238.482 para detalles adicionales. Los procedimientos de aislamiento de los aceites de semillas son bien conocidos en la técnica: (Young et al., Processing of Fats and Oils, en The Lipid Handbook, Gunstone et al., eds, Capítulo 5, pág. 253-257; Chapman & Hall: Londres (1994)). Por ejemplo, el aceite de soja es producido utilizando una serie de etapas que implican la extracción y purificación de un producto de aceite comestible de la semilla que transporta el aceite. Los aceites de soja y los subproductos de soja se elaboran utilizando los pasos generalizados que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Pasos generalizados para la producción de aceite y subproductos de soja		
Paso del Proceso	Proceso	Impurezas eliminadas y/o subproductos obtenidos
#1	Semilla de soja	
#2	Extracción de aceite	Harina
#3	Desgomado	Lecitina
#4	Refinado alcalino o físico	Gomas, ácidos grasos libres, pigmentos
#5	Lavado con agua	Jabón
#6	Blanqueamiento	Color, jabón, metal
#7	(hidrogenación)	
#8	(winterización)	Estearina
#9	Desodorización	Ácidos grasos libres, tocoferoles, esteroles, volátiles
#10	Productos de aceite	

Más específicamente, las semillas de soja son limpiadas, atemperadas, descascaradas, y descascarilladas, aumentando de ese modo la eficiencia de la extracción de aceite. La extracción de aceite se realiza generalmente mediante extracción con disolvente (p. ej., hexano), pero también se puede lograr mediante una combinación de

presión física y/o extracción con disolvente. El aceite resultante se denomina aceite crudo. El aceite crudo puede ser desgomado mediante hidratación con fosfolípidos y otros complejos de lípidos polares y neutros que facilitan su separación de la fracción (aceite de soja) de triglicéridos que no se hidratan. Las gomas de lecitina resultantes pueden procesarse adicionalmente para elaborar productos de lecitina comercialmente importantes utilizados en una variedad de alimentos y productos industriales como agentes de emulsificación y liberación (es decir, agentes antiadherentes). El aceite desgomado puede ser refinado adicionalmente para la eliminación de impurezas (principalmente ácidos grasos libres, pigmentos y gomas residuales). El refinado se realiza mediante la adición de un agente cáustico que reacciona con el ácido graso libre para formar jabón e hidrata los fosfátidos y las proteínas en el aceite crudo. El agua se utiliza para lavar las trazas de jabón formadas durante el refinado. El subproducto de la pasta de neutralización puede usarse directamente en piensos animales o acidularse para recuperar los ácidos grasos libres. El color se elimina a través de la adsorción con una tierra de blanqueo que elimina la mayor parte de los compuestos de clorofila y carotenoides. El aceite refinado puede ser hidrogenado, dando como resultado de ese modo grasas con diferentes propiedades de fusión y texturas. La winterización (fraccionamiento) puede ser utilizado para eliminar la estearina del aceite hidrogenado mediante cristalización en condiciones de enfriamiento cuidadosamente controladas. La desodorización (principalmente a través de la destilación del vapor al vacío) es el último paso y está diseñado para eliminar los compuestos que comunican olor o sabor al aceite. Durante el proceso de desodorización pueden ser eliminados otros valiosos subproductos, como los tocoferoles y esteroles. El destilado desodorizado que contiene estos subproductos puede ser vendido para la producción de vitamina E natural y otros productos farmacéuticos de alto valor. Los aceites y grasas refinados, blanqueados, hidrogenados, fraccionados y desodorizados pueden ser embalados y vendidos directamente o procesados adicionalmente en productos más especializados. Una referencia más detallada al procesado de las semillas de soja, a la producción del aceite de soja, y a la utilización del subproducto se puede encontrar en Erickson, Practical Handbook of Soybean processing and Utilization, The American OilChemist' Society and United Soybean Board (1995). El aceite de soja es líquido a temperatura ambiente, porque es relativamente bajo en ácidos grasos saturados en comparación con aceites tales como coco, palma, almendra de palma y manteca de cacao.

Los aceites de plantas y microbianos que contienen los PUFA que han sido refinados y/o purificados pueden ser hidrogenados, dando como resultado de ese modo grasas con distintas propiedades de fusión y texturas. Muchas grasas procesadas (que incluyen de untar, grasas para repostería, mantequillas duras, margarinas, mantecas para panadería, etc) requieren diferentes grados de solidez a temperatura ambiente y solo se pueden producir a través de la alteración de las propiedades físicas del aceite de origen. Esto se logra con mayor frecuencia a través de hidrogenación catalítica.

La hidrogenación es una reacción química en la que se añade hidrógeno a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con la ayuda de un catalizador tal como níquel. Por ejemplo, el aceite de soja alto oleico contiene ácidos grasos insaturados oleico, linoleico y linolénico, y cada uno de estos puede ser hidrogenado. La hidrogenación tiene dos efectos principales. En primer lugar, la estabilidad oxidativa del aceite se incrementa como resultado de la disminución del contenido de ácido graso insaturado. En segundo lugar, las propiedades físicas del aceite se cambian porque las modificaciones del ácido graso incrementan la temperatura de fusión dando como resultado una grasa semi-líquida o sólida a temperatura ambiente.

Hay muchas variables que afectan a la reacción de hidrogenación, lo que a su vez alteran la composición del producto final. Las condiciones de funcionamiento que incluyen presión, temperatura, tipo de catalizador y concentración, agitación y diseño del reactor están entre los parámetros más importantes que pueden ser controlados. Las condiciones de hidrogenación selectiva se pueden utilizar para hidrogenar los ácidos grasos más insaturados con preferencia frente a los menos insaturados. Para aumentar la estabilidad de los aceites líquidos se emplea a menudo hidrogenación muy ligera o parcial. Además la hidrogenación transforma un aceite líquido en una grasa físicamente sólida. El grado de hidrogenación depende del comportamiento deseado y de las características de fusión diseñadas para el producto final particular. Las mantecas líquidas (utilizadas en la fabricación de productos de panadería, grasas sólidas y mantecas utilizadas en las operaciones de freír y de asar comerciales) y aceites base para la fabricación de margarina están entre la miríada de posibles productos de aceites y grasas obtenidos a través de la hidrogenación. Una descripción más detallada de la hidrogenación y de los productos hidrogenados se puede encontrar en Patterson, H.B.W., Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice. The American Oil Chemists' Society (1994).

Los aceites hidrogenados han llegado a ser algo controvertidos debido a la presencia de isómeros trans de los ácidos grasos que resultan del proceso de hidrogenación. La ingestión de grandes cantidades de isómeros trans se ha relacionado con efectos perjudiciales para la salud incluyendo el aumento de las proporciones de lipoproteínas de baja densidad y de alta densidad en el plasma sanguíneo y el mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

Aceites que contienen PUFA para uso en los productos alimenticios, productos para una alimentación saludable, productos farmacéuticos y piensos animales

El mercado soporta actualmente una gran variedad de productos de alimentación humana y animal, incorporando ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 (particularmente, p. ej., ALA, GLA, ARA, EPA, DPA y DHA). Se contempla que los aceites vegetales/de semillas, de semillas modificadas y de biomasa microbiana y/o los aceites descritos en el presente documento que comprenden PUFA funcionarán en los productos de alimentación humana y animal para

comunicar los beneficios para la salud de las formulaciones actuales. En comparación con otros aceites vegetales, se cree que los aceites descritos en el presente documento funcionan de manera similar a otros aceites en aplicaciones alimentarias desde un punto de vista físico (por ejemplo, aceites parcialmente hidrogenados como el aceite de soja se utilizan ampliamente como ingredientes suaves de extender, margarina y mantecas para hornear y freír).

Los aceites vegetales/semillas, semillas modificadas y de biomasa microbiana y/o aceites que contienen ácidos grasos omega-3 y/o omega-6 serán adecuados para su uso en una variedad de productos de alimentación humana y animal que incluyen pero no se limitan a: sucedáneos de alimentos, productos cárnicos, productos de cereales, alimentos horneados, aperitivos y productos lácteos.

Además, los presentes aceites vegetales/de semillas, de semillas modificadas y biomasa y/o aceites microbianos se pueden utilizar en formulaciones para comunicar beneficio para la salud en alimentos médicos que incluyen productos nutricionales médicos y suplementos dietéticos, fórmula para lactantes, así como productos farmacéuticos. Un experto en la técnica del procesado de alimentos y en la formulación de alimentos comprenderá cómo puede añadirse la cantidad y composición de los aceites vegetales y microbianos en el producto alimenticio humano o animal. Tal cantidad se denominará en el presente documento cantidad "eficaz" y dependerá del producto alimenticio humano o animal, de la dieta para la que el producto esta diseñado para complementar o del estado médico para el que el alimento médico o producto nutricional médico está destinado a corregir o tratar.

Análogos de los alimentos se pueden elaborar utilizando los procesos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden citar sucedáneos de la carne, sucedáneos del queso, sucedáneos de la leche y similares. Sucedáneos de la carne elaborados a partir de sojas contienen proteína de soja o tofu y otros ingredientes mezclados entre sí para simular diversos tipos de carnes. Estas alternativas a la carne se venden como alimentos congelados, enlatados o desecados. Habitualmente, se pueden utilizar de la misma manera que los alimentos a los que sustituyen. Las alternativas a la carne elaboradas a partir de sojas son excelentes fuentes de proteínas, hierro y vitaminas B. Ejemplos de sucedáneos de la carne incluyen pero no se limitan a: sucedáneos de jamón, sucedáneos de embutidos, sucedáneos de tocino y similares.

Los sucedáneos de la alimentación pueden clasificarse como imitación o sustitutos en función de sus características funcionales y de composición. Por ejemplo, un queso de imitación sólo necesita parecerse al queso para el que está diseñado para reemplazar. Sin embargo, un producto puede en general denominarse un sustituto sólo si es nutricionalmente equivalente al queso que va a reemplazar y cumple con los mínimos requisitos de composición de ese queso. Por ello, el queso sustituto tendrá a menudo mayores niveles de proteína que los quesos de imitación y estará reforzado con vitaminas y minerales.

Sucedáneos de la leche o productos alimenticios no lácteos incluyen pero no se limitan a las leches de imitación y postres congelados no lácteos (p. ej., los elaborados a partir de sojas y/o productos de proteína de soja).

Los productos cárnicos abarcan una amplia variedad de productos. En los Estados Unidos, "carne" incluye "carnes rojas" elaboradas a partir de ganado vacuno, cerdos y ovejas. Además de las carnes rojas hay artículos de aves de corral que incluyen pollos, pavos, gansos, guineas, patos y los peces y mariscos. Hay una amplia variedad de productos de carne sazonados y procesados: frescos, curados y fritos, y curados y cocidos. Los embutidos y salchichas son ejemplos de productos cárnicos procesados. Por ello, la expresión "productos cárnicos" como se utiliza en el presente documento incluye pero no se limita a productos cárnicos procesados.

Un producto alimenticio de cereales es un producto alimenticio derivado del procesado de un grano de cereal. Un grano de cereal incluye cualquier planta de la familia de las gramíneas que producen un grano comestible (semilla). Los granos más populares son cebada, maíz, mijo, avena, quinua, arroz, centeno, sorgo, triticale, trigo y arroz silvestre. Ejemplos de un producto alimenticio de cereales incluyen pero no se limitan a: grano integral, grano triturado, sémola, harina, salvado, germen, cereales para el desayuno, alimentos extruidos, pastas y similares.

Un producto de alimentos horneados comprende cualquiera de los productos alimenticios de cereales mencionados anteriormente y se ha cocido al horno o procesado de una manera comparable a la cocción (es decir, desecándose o endureciéndose al someterlo al calor). Ejemplos de un producto de panadería incluyen, pero no se limitan a: pan, tartas, rosquillas, barras, pastas, pan rallado, snacks horneados, mini-biscuits, mini-crackers, mini-cookies y mini-pretzel. Como se mencionó anteriormente, los aceites descritos en el presente documento se pueden utilizar como ingrediente.

Un producto alimenticio snack comprende cualquiera de los productos alimenticios anteriores o descritos a continuación.

Un producto alimenticio frito comprende cualquiera de los productos alimenticios anteriores o descritos a continuación que se ha freido.

Un producto alimenticio saludable es cualquier producto alimenticio que comunique un beneficio para la salud. Muchos productos alimenticios derivados de semillas oleaginosas se pueden considerar como alimentos saludables.

Una bebida puede estar en una forma líquida o desecada en forma de polvo.

Por ejemplo, se pueden mencionar las bebidas no carbonatadas como zumos de frutas, frescos, congelados, enlatados o concentrado; bebidas de leche con sabor o sola, etc. Las fórmulas nutricionales para adultos y para niños son bien conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente (por ejemplo, Similac®, Ensure®, Jevity® y Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories).

Las fórmulas para niños son líquidos o polvos reconstituidos suministrados a lactantes y niños pequeños. "Fórmula infantil" se define en el presente documento como un producto nutricional enteral que puede ser un sustituto de la leche materna humana en la alimentación de lactantes y se compone, típicamente, de un porcentaje deseado de grasa mezclada con los porcentajes deseados de hidratos de carbono y proteínas en una solución acuosa (p. ej., véase el la patente de EE.UU. Nº 4.670.285). Basado en los estudios de composición de todo el mundo, así como los niveles especificados por los grupos de expertos, el promedio de la leche materna humana contiene típicamente aproximadamente 0,20% a 0,40% de ácidos grasos totales (suponiendo aproximadamente el 50% de calorías de grasas); y, en general la proporción de DHA a ARA el intervalo de aproximadamente 1: 1 a 1: 2 (véase, por ejemplo, las formulaciones de Enfamil LIPIL® (Mead Johnson & Company) y Similac Advance® (Ross Products Division, Abbott Laboratories)). Las fórmulas infantiles tienen un papel especial que jugar en las dietas de los niños porque son a menudo la única fuente de nutrientes para los niños; y, aunque la lactancia materna sigue siendo el mejor alimento para los bebés, la fórmula infantil es una segunda lo suficientemente parecida para que los bebes no sólo sobrevivan sino que prosperen.

Un producto lácteo es un producto derivado de la leche. Un sucedáneo de la leche o producto no lácteo es un derivado de una fuente distinta de la leche, por ejemplo, leche de soja como se comentó anteriormente. Estos productos incluyen, pero no se limitan a: leche entera, leche desnatada, productos de leche fermentados como el yogur o la leche agria, crema, mantequilla, leche condensada, leche deshidratada, blanqueador de café, crema de café, helado, queso, etc.

Productos alimenticios adicionales en los que los aceites que contienen PUFA descritos en el presente documento podrían estar incluidos son, por ejemplo, gomas de mascar, pasteles y glaseados, gelatinas y pudines, caramelos duros y blandos, mermeladas y jaleas, azúcar blanco granulado, sustitutos del azúcar, salsas dulces, coberturas y jarabes, y mezclas de polvo seco mezclado.

Un producto alimenticio saludable es un producto alimenticio que imparte un beneficio para la salud e incluye alimentos funcionales, alimentos medicinales, productos nutricionales médicos y suplementos dietéticos. Además, los aceites vegetales/de semillas, semillas modificadas y aceites microbianos descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones farmacéuticas estándar (por ejemplo, aceites que contienen PUFA de cadena larga podrían incorporarse fácilmente en cualquiera de los productos alimenticios anteriormente mencionados, para producir de ese modo un alimento funcional o médico). Las formulaciones más concentradas que comprenden PUFA incluyen cápsulas, polvos, comprimidos, geles blandos, cápsulas de gel, concentrados líquidos y emulsiones que se pueden utilizar como un suplemento dietético en seres humanos o en animales distintos de los seres humanos.

La comida para animales se define genéricamente en el presente documento como los productos destinados a usar como alimentación o para mezclar en la alimentación de animales distintos de los seres humanos. Los aceites vegetales/de semillas, de semillas modificadas y los aceites microbianos descritos en el presente documento se pueden usar como un ingrediente en varios alimentos para animales.

Más específicamente, aunque no limitado en el mismo, se espera que los aceites descritos en el presente documento se puedan usar dentro de los productos alimenticios para mascotas, rumiantes y productos alimenticios para aves de corral y productos alimenticios en acuicultura. Productos de alimentos para mascotas son aquellos productos destinados a la alimentación de animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, aves, reptiles y roedores). Estos productos pueden incluir los cereales y los productos alimenticios saludables antes mencionados, así como carne y subproductos cárnicos, productos de proteína de soja, productos grama y heno (por ejemplo, la alfalfa, fleo, avena o hierba cebadilla y verduras). Los productos alimenticios para rumiantes y aves de corral son aquellos en los que el producto está destinado a ser alimentado a un animal (por ejemplo, pavos, pollos, vacas y cerdos). Al igual que con los alimentos para mascotas anteriores, estos productos pueden incluir cereales y productos alimenticios saludables, productos de proteína de soja, carne y subproductos cárnicos, y productos de grama y heno listados anteriormente. Los productos alimenticios acuícolas (o "alimentos acuícolas") son aquellos productos destinados a ser utilizados en acuicultura, es decir, que se refiere a la propagación, cultivo, o cría de organismos acuáticos y/o animales en aguas dulces o marinas.

Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que partes y porcentajes están en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique lo contrario. Debe comprenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. De lo comentado anteriormente y de estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por ello, varias modificaciones de la invención como las

definidas en las reivindicaciones adjuntas además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción. Tales modificaciones también están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

El significado de las abreviaturas es el siguiente: "s" significa segundo (o segundos), "min" significa minuto (o minutos), "h" significa hora (u horas), "d" significa día (o días), "µl" significa microlitro (o microlitros), "ml" significa mililitro (o mililitros), "l" significa litro (o litros), "µM" significa micromolar, "mM" milimolar significa, "M" significa molar, "mmol" significa milimol (o milimoles), "µmol" significa micromol (o micromoles), "g" significa gramos (o gramos), "µg" se refiere a microgramo (o microgramos), "ng" significa nanogramo (o nanogramos), "u" significa unidad (o unidades), "pb" significa par de bases (o pares de bases) y "kb" significa kilobase (o kilobases).

Procedimientos generales:

Nomenclatura para casetes de expresión:

La estructura de una casete de expresión estará representada por un sistema de notación sencillo de "X::Y::Z", en el que X describe el fragmento promotor, Y describe el fragmento de la región que codifica el gen, y Z describe el fragmento terminador, que estas todos enlazados entre sí de forma operable.

Transformación y cultivo de Yarrowia lipolytica:

Cepas de Yarrowia lipolytica con Nº de acceso de ATCC, #20362, #76982 y #90812 fueron adquiridos de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las cepas de Yarrowia lipolytica se cultivaron típicamente a 28-30ºC en varios medios, según las recetas mostradas más abajo. Las placas de agar se Prepararon como se requiere mediante la adición de 20 g/l de agar a cada medio líquido, según la metodología estándar.

Medio agar YPD (por litro): 10 g de extracto de levadura [Difco], 20 g de Bacto peptone [Difco]; y 20 g de glucosa.

Medios Mínimos Básicos (MM) (por litro): 20 g de glucosa; 1,7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos; 1,0 g prolina y pH 6,1 (sin ajustar)

Medios Mínimos+Uracilo (MM+uracilo o MMU) (por litro): Preparar medios MM como anteriormente y añadir 0,1 g de uracilo y 0,1 g de uridina.

Medios Mínimos+Uracilo+Sulfonilurea (MMU+SU) (por litro): Preparar medios MMU como anteriormente y añadir 280 mg de sulfonilurea.

Medios Mínimos+Leucina (MM+leucina o MMLeu) (por litro): Preparar medios MM como anteriormente y añadir 0,1 g de leucina.

Medios Mínimos+Leucina+Uracilo (MMLeuUra) (por litro): Preparar medios MM como anteriormente y añadir 0,1 g de leucina, 0,1 g de uracilo y 0,1 g de uridina.

Medios Mínimos+Leucina+Lisina (MMLeuLvs) (por litro): Preparar medios MM como anteriormente y añadir 0,1 g de lisina y 0,1 g de leucina.

Medios Mínimos+Ácido 5-fluoroorótico (MM+5-FOA) (por litro): 20 g de glucosa, 6,7 g de base Nitrogenada de Levadura, 75 mg de de uracilo, 75 mg de uridina y la cantidad apropiada de FOA (Zymo Research Corp., Orange, CA), basada en la prueba de la actividad FOA frente a un intervalo de concentraciones desde 100 mg/l hasta 1.000 mg/l (ya que la variación se produce dentro de cada lote recibido del proveedor).

Medios Altos en Glucosa (HGM) (por litro): 80 g de glucosa, 2,58 g de KH_2PO_4 y 5,36 g de K_2HPO_4, pH 7,5 (no se necesita ajustar).

La transformación de Yarrowia lipolytica se realizo según el procedimiento de Chen, D.C. et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 48(2): 232-235 (1997)), a menos que se indique lo contrario. En pocas palabras, Yarrowia se manchó una placa de YPD y se cultivó a 30ºC durante aproximadamente 18 h. Varios grandes asas llenas de células se rasparon de la placa y se volvieron a suspender en 1 ml de tampón de transformación, que comprende: 2,25 ml de 50% de PEG, PM medio 3.350; 0,125 ml de acetato de litio 2 M, pH 6,0; 0,125 ml de DTT 2 M; y (opcionalmente) 50 µg de ADN de esperma de salmón cizallado. Entonces, aproximadamente 500 ng de ADN plásmido linealizado se incubaron en 100 µl de células resuspendidas y mantenidas 39ºC durante 1 hora con mezcla de vórtice a intervalos de 15 minutos. Las células se sembraron en placas de medio de selección, que se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días.

Análisis de ácidos grasos de Yarrowia lipolytica:

Para el análisis de ácidos grasos, las células se recogieron por centrifugación y los lípidos se extrajeron como se describe en Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917 (1959)). Ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por transesterificación del extracto lípido con metóxido de sodio (Roughan, G. y Nishida I.,

Arch Biochem Biophys. 276(1): 38-46 (1990)) y posteriormente se analizaron con un Hewlett-Packard 6890 GC equipado con una columna de 30 m x 0,25 mm (d.i) HP-INNOWax (Hewlett-Packard). La temperatura del horno fue desde 170ºC (mantenida 25 min) hasta 185ºC a 3,5ºC/min.

Para la transesterificación directa de base, el cultivo Yarrowia (3 ml) se recogió, se lavó una vez en agua destilada, y se secó en vacío en un Speed-Vac durante 5-10 min. Metóxido de sodio (100 µl de 1%) se añadió a la muestra, que después se agitó en vórtex y se balanceó durante 20 min. Después de añadir 3 gotas de NaCl 1 M y 400 µl de hexano, la muestra se agito en vórtex y se centrifugó. La capa superior, se retiró y se analizó mediante GC como se ha descrito anteriormente.

Construcción de cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica:

Cepa Y4305U3 de Y. lipolytica se utilizó como el anfitrión en los Ejemplos 52, 53 y 54, infra. La siguiente descripción es un resumen de la construcción de cepa Y4305U3, derivado de Yarrowia lipolytica ATCC #20362. La cepa Y4305U3 es capaz de producir aproximadamente 53,2% de EPA respecto a los lípidos totales a través de la expresión de una delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa (FIG. 44).

El desarrollo de la cepa Y4305U3 requiere la construcción de cepa Y2224 (un mutante resistente FOA desde una mutación autónoma del gen Ura3 de la cepa silvestre ATCC #20362 Yarrowia), cepa Y4001 (que producen 17% de EDA con un fenotipo Leu), cepa Y4001U1 (que producen 17% de EDA con un fenotipo Leu- y Ura-), cepa Y4036 (que producen 18% de DGLA con un fenotipo Leu-), cepa Y4036U (que producen 18% de DGLA con un fenotipo Leu- y Ura-), cepa Y4070 (que producen 12% de ARA con un fenotipo Ura-), cepa Y4086 (que producen el 14% de EPA), cepa Y4086U1 (Ura3-); cepa Y4128 (que producen el 37% de EPA), cepa Y4128U3 (Ura-), cepa Y4217 (que producen el 42% de EPA), cepa Y4217U2 (Ura-), cepa Y4259 (que producen 46,5% de EPA), cepa y Y4259U2 (Ura-).

Generación de la cepa Y2224: La cepa Y2224 se aisló de la siguiente manera: células de Yarrowia lipolytica ATCC #20362 de una placa de agar YPD se sembraron en estrías en una placa de MM (75 mg/l tanto de uracilo como de uridina, 6,7 g/l de YNB con sulfato de amonio, sin aminoácidos, y 20 g/l de glucosa) que contiene 250 mg/l de 5-FOA (Zymo Research). Las placas se incubaron a 28ºC, y cuatro de las colonias resultantes fueron parcheadas en placas MM por separado que contienen 200 mg/ml de 5-FOA y placas MM que carecen de uracilo y uridina. Esto se hizo para confirmar auxotrofia de Ura3 uracilo.

Generación de la cepa Y4001 para producir aproximadamente 17% de EDA del total de lípidos: Cepa Y4001 se creó a través de la integración del constructor pZKLeuN-29E3 (FIG. 45A). Este constructo, que comprende cuatro genes quiméricos (es decir, una delta-12 desaturasa, una elongasa $C_{16/18}$, y dos delta-9 elongasas), se integró en los loci Leu2 de la cepa Y2224 para permitir de ese modo la producción de EDA.

El constructo pZKLeuN-29E3 contenía los componentes que se muestran a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Descripción del plásmido pZKLeuN-29E3 (ID de SEC Nº: 315)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 315	Descripción de los componentes del fragmento y gen quimérico
BsiW I/Asc I (7797-7002)	Porción 3’ de 788 pb del gen Leu2 de Yarrowia (Nº A260230 de acceso al Banco de Genes)
Sph VPac I (4302-3591)	porción 5’ de 703 pb del gen Leu2 de Yarrowia (Nº AF260230 de acceso al Banco de Genes)
SWa I/BsiW I (10533-7797)	GPD::FmD12::Pex20, que comprende: • GPD: promotor GPD de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.259.255); • FmD12: gen delta-12 desaturasa de Fusarium moniliforme (ID de SEC Nº: 316) (etiquetada como "F.D12" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2005/047485); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)

Descripción del plásmido pZKLeuN-29E3 (ID de SEC Nº: 315)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 315	Descripción de los componentes del fragmento y gen quimérico
Bgl II/Swa I (12559-10533)	EXP1::EgD9eS::Lip1, que comprende: • EXP1: promotor de proteína de exportación (EXP1) de Yarrowia lipolytica (etiquetada como "Exp pro" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • EgD9eS: delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 318), derivada de Euglena gracilis (etiquetada como "EgD9E" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
Pme I/Cla I (12577-1)	FBAINm::EgD9eS::Lip2, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD9eS: gen delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 318), derivado de Euglena gracilis (etiquetado como "EgD9ES" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
Cla I/EcoR I (1-1736)	LoxP Ura3 LoxP, que comprende: • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320); • gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes); • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320)
EcoR I/Pac I (1736-3591)	YAT1::ME3S::Pex16, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente Nº U.S. 2006/0094102-A1); • ME3S: gen elongasa $C_{16/18}$ de codón optimizado (ID de SEC Nº: 321), derivado de M. alpina (publicación PCT Nº WO 2007/046817); • Pex16: secuencia de terminación Pex16 del gen Pex16 de Yarrowia (Nº U75433 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKLeuN-29E3 fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y2224 de Y. lipolytica (es decir, ATCC #20362 Ura3-) según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas sobre placas con Medio MMLeu, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias se recogieron y se sembraron en placas de selección con MM y MMLeu. Las colonias que crecieron en placas MMLeu pero no en placas MM se seleccionaron como cepas Leu-. Las colonias individuales de las cepas Leu- se utilizaron para inocular MMLeu líquido, y los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de la CG mostraron la presencia de EDA en los transformantes que contenían los 4 genes quiméricos de pZKLeuN-29E3, pero no en la cepa de control Yarrowia Y2224. La mayoría de las 36 cepas Leu- seleccionadas produjeron aproximadamente 12 a 16,9% EDA del total de lípidos. Tres cepas, designadas como cepas Y4001, Y4002 y Y4003 producían aproximadamente 174%, 17% y 17,5% de EDA del total de lípidos, respectivamente.

Las colonias individuales de las cepas Y4001, Y4002, y Y4003 se utilizaron para inocular MMLeu líquido, y los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM, y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, y los lípidos se extrajeron. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890. Los análisis de la GC mostraron que las cepas Y4001, Y4002 y Y4003 producían aproximadamente 24% EDA del total de lípidos.

Generación de la cepa Y4001U (Leu-, Ura-): La cepa Y4001U se creó por expresión temporal de la enzima recombinasa Cre en el plásmido pY116 (FIG. 45B) dentro de la cepa Y4001 para producir un fenotipo Leu- y Ura-. El constructor pY116 contenía los siguientes componentes.

Tabla 9

Descripción de Plásmido pY116 (ID de SEC Nº:323)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 323	Descripción de componentes de fragmento y de gen quimérico
1328-448	Plásmido ColE1 origen de replicación
2258-1398	Gen de resistencia a la Ampicilina (AmpR) para selección en E. coli
3157-4461	Secuencia de replicación autónoma de Yarrowia (ARS18; Nº A17608 de acceso al Banco de Genes)
SwaI/PacI 6667-4504	Gen Leu2 de Yarrowia (Nº AF260230 de acceso al Banco de Genes)
Swa I/Pme I (6667-218)	GPAT Cre XPR2, que comprende: • GPAT: promotor GPAT de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.264.949); • Cre: Gen P1 Cre de Enterobacteria phage para proteína recombinasa (Nº X03453 de acceso al Banco de Genes); • XPR2: ~100 pb de la región 3' del gen Xpr de Yarrowia (Nº M17741 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pY116 se utilizó para la transformación de células Y4001 recién cultivadas según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas que contenían MMLeuUra 280 μg/ml de sulfonilurea (etil clorimurón, E.I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE), y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 3 a 4 días. Se recogieron cuatro colonias y después se utilizaron para inocular 3 ml de YPD líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 1 día a 30ºC. Los cultivos se diluyeron 1:50.000 con los Medios MMLeuUra líquido, y 100 µl se sembraron en nuevas placas de YPD. Las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 días. Las colonias se recogieron y sembraron en placas de selección MMLeu y MMLeuUra. Las colonias que podrían crecer en placas MMLeuUra pero no en placas MMLeu se seleccionaron y se analizaron por CG para confirmar la presencia de C20:2 (EDA). Varias cepas, cada una con un fenotipo Leu- y Ura-, producían aproximadamente 17% EDA de los lípidos totales y colectivamente, se designaron como Y4001U. Una de estas cepas se designó como Y4001.

Generación de cepa Y4036 para producir aproximadamente 18% DGLA del total de lípidos: el constructo pKO2UF8289 (FIG. 46A; ID de SEC Nº: 324) se generó para integrar cuatro genes quiméricos (que comprenden una delta-12 desaturasa, una delta-9 elongasa, y dos delta-8 desaturasas mutantes) en el loci delta-12 de la cepa Y4001U1, para permitir de ese modo la producción de DGLA. El constructo pKO2UF8289 contenía los siguientes componentes:

Tabla 10

Descripción de plásmido pKO2UF8289 (ID de SEC Nº: 324)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 324	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (10337-9600)	Porción 5’ del gen delta-12 desaturasa de Yarrowia (ID de SEC Nº: 325) (etiquetado como "YLD12-N" en la Figura; patente de EE.UU. 7.214.491)
EcoRI/SphI (13601-13045)	Porción 3’ del gen delta-12 desaturasa de Yarrowia (ID de SEC Nº: 325) (etiquetado como "YL12-C" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2004/104167; patente de EE.UU. 7,214,491)

Descripción de plásmido pKO2UF8289 (ID de SEC Nº: 324)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 324	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
SwaI/BsiWI (7088-9600)	FBAINm::EgD8M::Pex20, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327) (etiquetado como "D8S-23" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
SwaI/PmeI (7088-4581)	YAT1 FmD12 OCT, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente Nº US 2006/0094102-A1); • FmD12: gen delta-12 desaturasa Fusarium moniliforme (ID de SEC Nº: 316) (etiquetado como "F.D12" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2005/047485); • OCT: secuencia de terminación OCT del gen OCT de Yarrowia (Nº X69988 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/PacI (4581-2124)	EXP1::EgD8M::Pex16, que comprende: • EXP1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2006/052870 y publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327) (etiquetado como "D8-23" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; publicación PCT Nº WO 2006/012326; patente de EE.UU. 7.256.033); • Pex16: Pex16 secuencia de terminación del gen Pex16 de Yarrowia (Nº U75433 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/ClaI (2038-1)	GPAT::EgD9e::Lip2, que comprende: • GPAT: promotor GPAT de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2006/031937; patente de EE.UU. 7.264.949); • EgD9e: gen delta-9 elongasa de Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 329) (etiquetado como "EgD9E" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (13601-1)	LoxP Ura3 LoxP, que comprende: • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320); • gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes); • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320)

El plásmido pKO2UF8289 fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4001 U1 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MMLeu, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias se seleccionaron y se sembraron en placas de selección MMLeu a 30ºC durante 2 días. Estas células se utilizaron para inocular los medios MMLeu líquidos, y los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por transesteriicación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis mostraron la presencia de DGLA en los transformantes que contenían los genes quiméricos de 4 pKO2UF8289, pero no en la cepa Y4001 U1 madre. La mayoría de las 96 cepas producían entre 7% y 13% DGLA del total de lípidos. Seis cepas, designadas como Y4034, Y4035, Y4036, Y4037, Y4038 e Y4039, producían aproximadamente 15%, 13,8%, 18,2%, 13,1%, 15,6% y 13,9% DGLA del total de lípidos, respectivamente.

Generación de la cepa Y4036U {Leu-, Ura3-): el constructo pY116 (FIG. 45B; ID de SEC Nº: 323) se utilizó para expresar temporalmente una enzima recombinasa Cre en la cepa Y4036. Esta liberó el gen Ura3 emparedado con LoxP del genoma.

El plásmido pY116 se utilizó para transformar la cepa Y4036 según los Procedimientos Generales. Después de la transformación, las células se sembraron en placas sobre MMLeuUra, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias individuales cultivadas sobre placas MMLeuUra eran recogidas y rayadas en medio líquido de YPD. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 1 día a 30ºC para curar el plásmido pY116. Las células de los cultivos desarrollados fueron rayadas en placas de MMLeuUra. Después de dos días a 30ºC, las colonias individuales se volvieron a rayar sobre placas con MMLeuUra, MMU y MMLeu. Se seleccionaron las colonias que podría n crecer en placas con MMLeuUra, pero no en las placas MMU o MMLeu. Una cepa con fenotipos Leu- y Ura- se designó como Y4036U (Ura-, Leu-).

Generación de cepas Y4069 Y Y4070 para producir aproximadamente 12% de ARA del total de lípidos: el constructo pZKSL-555R (FIG. 46B; ID de SEC Nº: 331) se generó para integrar tres genes delta-5 desaturasa en el loci Lys de la cepa Y4036U para permitir de ese modo la producción de ARA. El plásmido pZKSL-555R contenía los siguientes componentes:

Tabla 11

Descripción de plásmido pZKSL-555R (ID de SEC Nº:331)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 331	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (3321-2601)	Porción 5’ de 720 pb del gen Lys5 de Yarrowia (Nº M34929 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (6716-6029)	Porción 3’ de 687 pb del gen Lys5 de Yarrowia (Nº M34929 de acceso al Banco de Genes)
BglI/BsiWI (15-2601)	EXP1::EgD5S::Pex20, que comprende: • EXP1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) Yarrowia lipolytica (etiquetado como "EXP" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 200610115881); • EgD5S: delta-5 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 332), derivada de Euglena gracilis (publicación de patente de EE.UU. 2007-0292924-A1); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/PmeI (11243-1)	YAT1 RD5S OCT, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • RD5S: delta-5 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 334), derivada de CCMP626 de Peridinium sp. (etiquetado como "RD5S(626)" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2007-0271632-A1); • OCT: secuencia de terminación OCT del gen OCT de Yarrowia (Nº X69988 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/PacI (9500-6716)	FBAIN::EgD5::Aco, que comprende: • FBAIN: promotor FBAIN de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD5: delta-5 desaturasa de Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 336) (etiquetado como "EgD5WT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2007-0292924-A1) con la eliminación de sitios de enzimas de restricción interna EcoRI, Bg/II, HindIII y NcoI [mutaciones etiquetadas como "M.EI", "M.BII", "M.H" y "M.N", respectivamente]; • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/ClaI (9500-11243)	Gen Leu2 de Yarrowia (Nº M37309 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKSL-555R fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4036U según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MMLeuLys, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias individuales eran después re-rayadas en placas MMLeuLys, y las colonias resultantes se utilizaron para inocular MMLeuLys líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de ARA en los transformantes que contenían los 3 genes quiméricos de pZKSL-555R, pero no en la cepa Y4036U madre. La mayoría de las 96 cepas seleccionadas producían ~10% de ARA del total de lípidos. Cuatro cepas, designadas como Y4068, Y4069, Y4070 e Y4071 producían aproximadamente 11,7%, 11,8%, 11,9% y 11,7% de ARA del total de lípidos, respectivamente. Análisis posteriores mostraron que los tres genes quiméricos de pZKSL-555R no se integraron en el sitio Lys5 en las cepas Y4068, Y4069, Y4070 e Y4071. Todas las cepas poseían un fenotipo Lys+.

El genotipo final de la cepa Y4070, con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC #20362, fue Ura-, desconocido 1-, desconocido 3-, Leu+, Lys+, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, YAT1::ME3S::Pex16, GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::RD5S::OCT.

Generación de cepa Y4086 para producir aproximadamente 14% de EPA del total de lípidos:

El constructo pZP3-Pa777U (FIG. 47A; ID de SEC Nº:338), se generó para integrar tres genes delta-17 desaturasa en el loci POX3 (Nº AJ001301 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4070 para permitir de ese modo la producción de EPA. El plásmido pZP3-Pa777U contenía los siguientes componentes:

Tabla 12

Descripción de plásmido pZP3-Pa777U (ID de SEC Nº: 338)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:338	Descripción de componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (3527-4297)	Porción 5' de 770 pb del gen Pox3 de Yarrowia (Nº AJ001301 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (1-827)	Porción 3' de 827 pb del gen Pox3 de Yarrowia (Nº AJ001301 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/SwaWI (6624-4457)	YAT1::PaD17S::Lip1, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • PaD17S: de codón optimizado delta-17 desaturasa (ID de SEC Nº: 339), derivada de Pythium aphanidermatum (publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0125326); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/PmeI (8359-10611)	EXP1::PaD17::Pex16, que comprende: • EXP1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "Exp" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • PaD17: gen delta-17 desaturasa de Pythium aphanidermatum (ID de SEC Nº: 341) (etiquetado como "PaD17WT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0125326); • Pex16: secuencia de terminación Pex16 del gen Pex16 de Yarrowia (Nº U75433 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/PacI (10611-1)	FBAINm::PaD17::Aco, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • PaD17: gen delta-17 desaturasa de Pythium aphanidermatum (ID de SEC Nº: 341) (etiquetado como "PaD17WT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0125326); • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (6624-8359)	LoxP Ura3 LoxP, que comprende: • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320); • gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes); • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320)

El plásmido pZP3-Pa777U fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4070 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MM, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias individuales se re-estriaron después en placas MM, y las colonias resultantes se utilizaron para inocular MMLeuLys líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min de durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de EPA en los transformantes que contenían los 3 genes quiméricos de pZP3-Pa777U, pero no en la cepa madre Y4070. La mayoría de las 96 cepas seleccionadas producían 10 a 13% de EPA del total de lípidos. Dos cepas, designadas como Y4085 y Y4086, producían aproximadamente 14,2% y 13,8% de EPA del total de lípidos, respectivamente.

El genotipo final de la cepa Y4086, con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC #20362, era Ura3+, Leu+, Lys+, desconocido 1-, desconocido 2-, YALI0F24167g-, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, YAT1::ME3S::Pex16, GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::RD5S::OCT, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco.

Generación de la cepa Y4086U1 (Ura3-): la cepa Y4086U1 se creó por expresión temporal de la enzima recombinasa Cre en el constructo pY117 (FIG. 47B; ID de SEC Nº: 343) dentro de la cepa Y4086 para producir un fenotipo Ura-. Esto liberó el gen URA3 emparedado con LoxP del genoma. La enzima AHAS Yarrowia mutada en el plásmido pY117 confirió SUR, que se utilizó como un etiquetador de cribado positivo.

El plásmido pY117 se obtuvo a partir del plásmido pY116 (descrito supra, y en la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868) mediante la inserción del gen AHAS mutante flanqueado por sitios PacI-SwaI en el PacI-SwaI digirió el pY116, reemplazando de ese modo al etiquetador seleccionable LEU con el etiquetador sulfonilurea. El constructo pY117 contenía de ese modo los siguientes componentes:

Tabla 13

Descripción del plásmido pY117 (ID de SEC Nº: 343)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 343	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
1328-448	Plásmido Co1E1 origen de replicación
2258-1398	Gen resistente a ampicilina (AmpR) para selección en E. coli
2438-2838	Origen de replicación f1 en E. coli
3157-4461	Secuencia de replicación autónoma Yarrowia (ARS18; Nº A17608 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SwaI 4504-7498	Gen AHAS de Yarrowia lipolytica (Nº XP_501277 de acceso al Banco de Genes) que comprende una mutación W497L (ID de SEC Nº: 344; publicación PCT Nº WO 2006/052870)
SwaI/PmeI 7498-218	GPAT Cre XPR, que comprende: • GPAT: promotor GPAT de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2006/031937; patente de EE.UU. 7.264.949); • Cre: Gen Bacteriofago P1 Cre para proteína recombinasa (Nº X03453 de acceso al Banco de Genes) excepto para cambio de base individual (T4G) dando como resultado un cambio de aminoácido individual (S2A) para crear un sitio NcoI para conveniencia de la clonación; • XPR: ~100 pb de la región 3' del gen Xpr de Yarrowia (Nº M17741 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pY117 se utilizó para transformar la cepa Y4086 según los Procedimientos Generales. Después de la transformación, las células se sembraron en placas con MMU+SU (280 μg/ml de sulfonilurea; también conocido como clorimurón etil, E.I. duPont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, DE), y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias individuales SU^R cultivadas en placas MMU+SU eran recogidos y rayadas en medio líquido de YPD, y se cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 1 día a 30ºC para curar el plásmido pY117. Las células de los cultivos desarrollados fueron rayadas en placas MMU. Después de dos días a 30ºC, las colonias individuales se volvieron a rayar sobre placas MM y MMU. Se seleccionaron aquellas colonias que podría n crecer

en MMU, pero no en las placas MM. Dos de estas cepas con fenotipos Ura- se designaron como Y4086U1 y Y4086U2 (Ura-).

Generación de la cepa Y4128 para producir aproximadamente 37% de EPA del total de lípidos:

El constructo pZP2-2988 (FIG. 48A; ID de SEC Nº: 345) se generó para integrar un gen delta-12 desaturasa, dos genes delta-8 desaturasa y uno gen delta-9 elongasa en los loci Pox2 (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4086U1, para de este modo permitir una mayor nivel de producción de EPA. El plásmido pZP2-2988 contenía los siguientes componentes:

Tabla 14

Descripción del plásmido pZP2-2988 (ID de SEC Nº: 345)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 345	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BiWI (3083-2273)	Porción 5' de 803 pb del gen Pox2 de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (6446-5791)	Porción 3' de 649 pb del gen Pox2 de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/BsiWI (347-2273)	FBA::EgD9eS::Pex20, que comprende: • FBA: promotor FBA de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD9eS: delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 318), derivada de Euglena gracilis (publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/PmeI (13318-347)	GPM/FBAIN FmD12S OCT, que comprende: • GPM/FBAIN: promotor GPM/FBAIN quimérico de Yarrowia lipolytica (separadamente etiquetado como "GPM" e "intrón FBA" en la Figura) (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • FmD12S: delta-12 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 346), derivada de Fusarium moniliforme (etiquetado como "F.D12S" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2005/047485); • OCT: secuencia de terminación OCT del gen OCT Yarrowia (Nº X69988 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (13318-11581)	LoxP Ura3 LoxP, que comprende: • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320); • gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes); • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320)
EcoRII/SwaI (11581-8884)	GPDIN::EgD8M::Lip1, que comprende: • GPDIN: promotor GPDIN de Yarrowia lipolytica (publicación de patente de EE.UU. 2006/0019297-A1); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
SwaI/PacI (8884-6446)	YAT1 EgD8M ACO, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Aco: secuencia de terminación Aco del gene Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZP2-2988 fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4086U1 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MM, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 2 a 3 días. Las colonias individuales se rayaron en placas MM, y las colonias resultantes se utilizaron para inocular MMLeuLys líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM, y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que la mayoría de las 96 cepas seleccionadas producían 12% a 15,6% de EPA del total de lípidos. Dos cepas, designadas como Y4128 y Y4129, produjeron aproximadamente 37,6% a 16,3% de EPA del total de lípidos, respectivamente.

El genotipo final de la cepa Y4128, con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC #20362, era: YALI0F24167g-, Pex10-, desconocido 1-, desconocido 2-, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, GPM/FBAIN::FmD12S::OCT, YAT1::ME3S::Pex16, GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBA::EgD9eS::Pex20, FBAINm::EgD8M::Pex20, EXP1::EgD8M::Pex16, GPDIN::EgD8M::Lip1, YAT1::EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::RD5S::OCT, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco. La cepa Y4128 de Yarrowia lipolytica se depositó en la American Type Culture Collection el 23 de agosto de 2007 y lleva la designación ATCC PTA-8614.

Generación de cepas Y4128U: con el fin de interrumpir el gen Ura3 en la cepa Y4128, el constructo pZKUE3S (FIG. 48B; ID de SEC Nº: 351) fue creado para integrar un gen quimérico EXP1::ME3S::Pex20 en el gen Ura3 de la cepa Y4128. El plásmido pZKUE3S contenía los siguientes componentes:

Tabla 15

Descripción del plásmido pZKUE3S(ID de SEC Nº: 351)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 351	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
BsiWI/PacI (318-1038)	Porción 5' de 721 pb del gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)
SphI/PmeI (3915-4594)	Porción 3' de 729 pb del gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/BsiWI (4628-318)	EXP1::ME3S::Pex20, que comprende: • EXP1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "Exp" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 200610115881); • ME3S: gen elongasa $C_{16/18}$ de codón optimizado (ID de SEC Nº: 321), derivada de Mortierella alpina (publicación PCT Nº WO 2007/046817); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
2149-1269	Plásmido Co1E1 origen de replicación
3079-2219	Gen resistente a la ampicilina (AmpR) para selección en E. coli
3659-3259	Origen f1

El plásmido pZKUE3S fue digerido con /PacI/SphI y después se utilizó para transformar la cepa Y4128 según los Procedimientos Generales. Después de la transformación, las células se sembraron en placas de selección MM+5-FOA, y las placas se mantuvieron durante a 30ºC durante 2 a 3 días.

Un total de 24 transformantes cultivados en placas de selección MM+5-FOA se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas MM+5-FOA recién preparadas. Las células fueron retiradas de las placas, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de entre 10-15% de EPA en todos los transformantes con pZKUE3S de las placas. Las cepas designadas como Y4128U1, Y4128U2, Y4128U3, Y4128U4, Y4128U5 e Y4128U6 producían 12,9%, 14,4%, 15,2%, 15,4%, 14% y 10,9% de EPA, respectivamente (colectivamente, Y4128U).

La discrepancia en el% de EPA cuantificado en Y4128 (37,6%) frente a Y4128U (promedio 13,8%) se basa en diferentes condiciones de cultivo. Específicamente, el cultivo anterior era analizado después de dos días de

desarrollo en cultivo líquido, mientras que el segundo cultivo era analizado después de cultivo sobre una placa de agar. Los solicitantes han observado un aumento de 2-3 veces en el % de EPA, al comparar Los resultados de las placas de agar con los del cultivo líquido. Así, aunque Los resultados no son directamente comparables, ambas cepas Y4128 e Y4128U muestran alta producción de EPA.

Generación de la cepa Y4217 para producir aproximadamente 42% de EPA del total de lípidos: el constructo pZKL2-5U89GC (FIG. 49A; ID de SEC Nº: 348) se generó para integrar solo un gen delta-9 elongasa, un gen delta-8 desaturasa, una delta 5 desaturasa y el gen diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT1) de Yarrowia lipolytica en los loci Lip2 (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4128U3 para permitir con ello un mayor nivel de producción de EPA. El plásmido pZKL2-5U89GC contenía los siguientes componentes:

Tabla 16

Descripción del plásmido pZKL2-5U89GC (ID de SEC Nº: 348)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:348	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (730-1)	Porción 5' de 722 pb del gen Lip2 de Yarrowia (etiquetado como "Lip2.5N" en la Figura; (Nº A012632 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (4141-3438)	Porción 3' de 697 pb del gen Lip2 de Yarrowia (etiquetado como "Lip2.3N" en la Figura; Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
SwaI/BsiWI (13382-1)	YAT1 YICPT1 Aco, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • YICPT1: Gen diacilglicerol-colinafosfotransferasa de Yarrowia lipolytica (ID de SEC Nº: 349) (etiquetado como "CPT1" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2006/052870); • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/SwaI (10745-13382)	FBAINm::EgD8M::Lip1 que comprende: • FBAIN: promotor FBAIN de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327) (etiquetado como "D8S-23" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/ClaI (10745-8650)	GPD::EgD9eS::Lip2, que comprende: • GPD: promotor GPD de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "GPD Pro" en la Figura; patente de EE.UU. 7.259.255); • EgD9eS: gen delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 318), derivada de Euglena gracilis (etiquetado como "EgD9ES" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (8650-6581)	Yarrowia gen Ura3 (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/PacI (6581-4141)	YAT1 EgDD5S ACO, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • EgD5S: delta-5 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 332), derivada de Euglena gracilis (publicación de patente de EE.UU. 2007-0292924-A1); • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKL2-5U89GC fue digerido AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4128U3 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MM, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 3 a 4 días. Las colonias individuales se volvieron a rayar sobre placas de MM, y las

colonias resultantes se utilizaron para inocular MM líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM, y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que la mayoría de las 96 cepas seleccionadas producían 32 a 39,9% de EPA del total de lípidos. Seis cepas, designadas como Y4215, Y4216, Y4217, Y4218, Y4219 y Y4220, producían aproximadamente 41,1%, 41,8%, 41,7%, 41,1%, 41% y 41,1% de EPA del total de lípidos, respectivamente. El genotipo final de cada cepa, con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC #20362, era: YALI0C18711g-, Pex10-, YALI0F24167g-, desconocido 1-, desconocido 3-, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, GPM/FBAIN::FmD12S::OCT, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::ME3S::Pex20, GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBA::EgD9eS::Pex20, GPD::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAINm::EgD8M::Lip1, EXP1::EgD8M::Pex16, GPDIN::EgD8M::Lip1, YAT1::EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::EgD5S::Aco, YAT1::RD5S::OCT, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, YAT1::YICPT1::ACO.

Generación de la cepa Y4217U2 (Ura3-): con el fin de interrumpir el gen Ura3 en la cepa Y4217, el constructo pZKUE3S (FIG. 48B; ID de SEC Nº: 351) se utilizó para integrar un gen quimérico EXP1::ME3S::Pex20 en el gen Ura3 de la cepa Y4217 después de la transformación, las células se sembraron en placas de selección MM+5-FOA, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 3 a 4 días.

Un total de 6 de transformantes cultivados en placas MM+5-FOA se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas MM y placas MM+5-FOA. Todas las 6 cepas tenían un fenotipo Ura (es decir, las células podrían crecer en las placas de MM+5-FOA, pero no en las placas de MM). Las células se rasparon de las placas MM+5-FOA, y los lípidos se extrajeron. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de 18,7% a 28,6% de EPA en todos los transformantes con pZKUE3S cultivado en placas MM+5-FOA. Dos cepas, designadas cepas Y4217U1 e Y4217U2, producían el 22,5% y el 28,6% de EPA, respectivamente.

Generación de la cepa Y4259 para producir aproximadamente 46,5% de EPA del total de lípidos:

El constructo pZKL1-2SP98C (FIG. 49B; ID de SEC Nº: 352) se generó para integrar un gen delta-9 elongasa, un gen delta- 8 desaturasa, un gen delta-12 desaturasa y un gen diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT1) de Yarrowia lipolytica en los loci Lip1 (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4217U2, para permitir de ese modo un mayor nivel de producción de EPA. El plásmido pZKL1-2SP98C contenía los siguientes componentes:

Tabla 17

Descripción del plásmido pZKL1-2SP98C (ID de SEC Nº: 352)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:352	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (3474-2658)	Porción 5’ de 809 pb del gen Lip1 de Yarrowia (etiquetado como "Lip1-5'N" en la Figura; Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (6951-6182)	Porción 3’ de 763 pb del gen Lip1 de Yarrowia (etiquetado como "Lip1.3N" en la Figura; Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
SwaI/BsiWI (1-2658)	GPD YICPT1 Aco, que comprende: • GPD: promotor GPD de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.259.255); • YICPT1: Gen diacilglicerol-colinafosfotransferasa de Yarrowia lipolytica (ID de SEC Nº: 349) (etiquetado como "CPT1" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2006/052870); • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)

Descripción del plásmido pZKL1-2SP98C (ID de SEC Nº: 352)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:352	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
PmeI/SwaI (13241-1)	FBAINm::EgD8M::Lip1 que comprende: • FBAIN: promotor FBAIN de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº:327; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/ClaI (13241-11385)	YAT1 EgD9eS Lip2, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • EgD9eS: gen delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 318), derivada de Euglena gracilis (etiquetado como "EgD9ES" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (11385-9648)	LoxP Ura3:LoxP, que comprende: • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320); • gen Ura3 Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes); • secuencia LoxP (ID de SEC Nº: 320)
EcoRI/PacI (9648-6951)	EXP1 FmD12S ACO, que comprende: • EXP 1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "Exp" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • FmD12S: delta-12 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 346), derivada de Fusarium moniliforme (etiquetado como "FD12S" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2005/047485); • Aco: secuencia de terminación Aco del en Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKL1-2SP98C fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4217U2 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MM, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 3 a 4 días. Las colonias individuales se volvieron a rayar sobre placas de MM, y las colonias resultantes se utilizaron para inocular MM líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM, y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que la mayoría de las 72 cepas seleccionadas producían 40-44% de EPA del total de lípidos. Seis cepas, designadas como Y4259, Y4260, Y4261, Y4262, Y4263 e Y4264, producían aproximadamente 46,5%, 44,5%, 44,5%, 44,8%, 44,5% y 44,3% de EPA del total de lípidos, respectivamente.

El genotipo final de la cepa Y4259 con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC #20362 era: YALI0C18711g-, Pex10-, YALI0F24167g-, desconocido 1-, desconocido 3-, desconocido 8-, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, GPM/FBAIN::FmD12S::OCT, EXP1::FmD12S::Aco, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::ME3S::Pex20 (2 copias), GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBA::EgD9eS::Pex20, GPD::EgD9eS::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1 (2 copias), EXP1::EgD8M::Pex16, GPDIN::EgD8M::Lip1, YAT1::EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::EgD5S::Aco, YAT1::RD5S::OCT, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, YAT1::YlCPT1::ACO, GPD::YlCPT1::ACO.

Generación de la cepa Y4259U2 (Ura3-): con el fin de interrumpir el gen Ura3 en la cepa Y4259, el constructo pZKUM (FIG. 50A; ID de SEC Nº: 353) se utilizó para integrar un gen mutante Ura3 en el gen Ura3 de la cepa Y4259. El plásmido pZKUM contenía los siguientes componentes:

Tabla 18

Descripción del plásmido pZKUM (ID de SEC Nº: 353)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:353	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
SalI/PacI (32845-1)	Gen Ura3 mutante sintético (ID de SEC Nº: 354, en donde el fragmento de ADN de 1459 pb contiene una eliminación de 33 pb de +21 a +53, una eliminación de 1 pb de +376 y una eliminación de 3 pb de +400 a +403 de la región codificante Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes))
1112-232	Plásmido Co1E1 origen de replicación
2042-1182	Gen resistente a la ampicilina (AmpR) para selección en E. coli

Se recogieron un total de de 3 de transformantes cultivados en placas MM+5-FOA y se volvieron a rayar en placas MM y placas MM+5-FOA. Todas las 3 cepas tenían un fenotipo Ura (es decir, las células podrían crecer en placas MM+5-FOA, pero no en las placas MM). Las células se rasparon de las placas MM+5-FOA, y los lípidos se extrajeron. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de 31,4%, 31% y 31,3% de EPA en los transformantes #1, #2 y #3 con pZKUM cultivado en placas MM+5-FOA. Estas tres cepas eran cepas designadas como Y4259U1, Y4259U2 e Y4259U3, respectivamente (colectivamente, Y4259U).

Generación de la cepa Y4305 para producir aproximadamente 53% de EPA del total de lípidos:

El constructo pZKD2-5U89A2 (FIG. 50B; ID de SEC Nº: 355), se ha generado para integrar solo un gen delta-9 elongasa, un gen delta-5 desaturasa, un gen delta 8 desaturasa y un gen delta-12 desaturasa en los loci diacilglicerol aciltransferasa (DGAT2) de la cepa Y4259U2, para permitir de ese modo un mayor nivel de producción de EPA. El plásmido pZKD2-5U89A2 contenía los siguientes componentes:

Tabla 19

Descripción del plásmido pZKD2-5U89A2 (ID de SEC Nº: 355)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 355	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
AscI/BsiWI (1-736)	Porción 5’ de 728 pb del gen DGAT2 de Yarrowia (ID de SEC Nº: 356) (etiquetado como "YLDGAT5"' en la Figura; patente de EE.UU. 7.267.976)
PacI/SphI (4164-3444)	Porción 3’ de 714 pb del gen DGAT2 de Yarrowia (ID de SEC Nº: 356) (etiquetado como "YLDGAT3’" en la Figura; patente de EE.UU. 7.267.976)
SwaI/BsiWI (13377-1)	YAT1 FmD12S Lip2, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • FmD12S: delta-12 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 346), derivada de Fusarium moniliforme (etiquetado como "F.D12S" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2005/047485); • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/SwaI (10740-13377)	FBAINm::EgD8M::Lip1 que comprende: • FBAIN: promotor FBAIN de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD8M: delta-8 desaturasa mutante sintética (ID de SEC Nº: 327; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868), derivada de Euglena gracilis ("EgD8S"; patente de EE.UU. 7.256.033); • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)

Descripción del plásmido pZKD2-5U89A2 (ID de SEC Nº: 355)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 355	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
ClaI/PmeI (8846-10740)	YAT1 E389D9eS OCT, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (etiquetado como "YAT" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1); • E389D9eS: delta-9 elongasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 358), derivada de CCMP389 de Eutreptiella sp. (etiquetado como "D9ES-389" en la Figura; publicación PCT Nº WO 2007/061742); • OCT: secuencia de terminación OCT del gen OCT de Yarrowia (Nº X69988 de acceso al Banco de Genes)
ClaI/EcoRI (8846-6777)	Gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)
EcoRI/PacI (6777-4164)	EXP1 EgD5S ACO, que comprende: • EXP1: promotor de la proteína de exportación (EXP1) Yarrowia lipolytica (etiquetado como "Exp" en la Figura; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • EgD5S: delta-5 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 332), derivada de Euglena gracilis (publicación de patente de EE.UU. 2007-0292924-A1); • Aco: secuencia de terminación Aco del gen Aco de Yarrowia (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKD2-5U89A2 fue digerido con AscI/SphI y después se utilizó para la transformación de la cepa Y4259U2 según los Procedimientos Generales. Las células transformadas se sembraron en placas de MM, y las placas se mantuvieron a 30ºC durante 3 a 4 días. Las colonias individuales se rayaron en placas MM, y las colonias resultantes se utilizaron para inocular MM líquido. Los cultivos líquidos se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días a 30ºC. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM, y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, y se extrajeron los lípidos. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que la mayoría de las 96 cepas seleccionadas producían 40-46% de EPA del total de lípidos. Cuatro cepas, designadas como Y4305, Y4306, Y4307 e Y4308, produjeron aproximadamente 53,2%, 46,4%, 46,8% y 47,8% de EPA del total de lípidos, respectivamente. El perfil de lípidos completo de Y4305 es el siguiente: 16:0 (2,8%), 16:1 (0,7%), 18:0 (1,3%), 18:1 (4,9%), 18:2 (17,6%), ALA (2,3%), EDA (3,4%), DGLA (2,0%), ARA (0,6%), ETA (1,7%) y EPA (53,2%). El % en peso de células secas (dcw) de los lípidos totales era de 27,5.

El genotipo final de la cepa Y4305 con respecto al tipo silvestre Yarrowia lipolytica ATCC SCP2- era #20362 (YALI0E01298g), YALI0C18711g-, Pex10-, YALI0F24167g-, desconocido 1-, desconocido 3-, desconocido 8, GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::OCT, GPM/FBAIN::FmD12S::OCT, EXP1::FmD12S::Aco, YAT1::FrpD12S::Lip2, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::ME3S::Pex20 (3 copias), GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBA::EgD9eS::Pex20, GPD::EgD9eS::Lip2, YAT1::EgD9eS::Lip2, YAT1::E389D9eS::OCT, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1 (2 copias), EXP1::EgD8M::Pex16, GPDIN::EgD8M::Lip1, YAT1::EgD8M::Aco, FBAIN::EgD5::Aco, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::EgD5S::Aco, EXP1::EgD5S::ACO, YAT1::RD5S::OCT, YAT1::PaD17S::Lip1, EXP1::PaD17::Pex16, FBAINm::PaD17::Aco, YAT1::YICPT1::ACO, GPD::YICPT1::ACO.

Generación de la cepa Y4305U3 (Ura3-): con el fin de interrumpir el gen Ura3 en la cepa Y4305, el constructo pZKUM (FIG. 50A; ID de SEC Nº: 353) se utilizó para integrar un gen mutante Ura3 en el gen Ura3 de la cepa Y4305. Se recogieron un total de 8 transformantes cultivados en placas MM+5-FOA y se volvieron a rayar sobre placas MM y placas MM+5-FOA, por separado. Todas las 8 cepas tenían un fenotipo Ura (es decir, las células podrían crecer en placas MM+5-FOA, pero no en las placas MM). Las células se rasparon de las placas MM+5-FOA, y los lípidos se extrajeron. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de 37,6%, 37,3% y 36,5% de EPA en los transformantes #1, #6 y #7 de pZKUM cultivados en placas MM+5-FOA. Estas tres cepas se designaron como cepas Y4305U1, Y4305U2 e Y4305U3, respectivamente (colectivamente, Y4305U).

Construcción de la cepa Y4184U de Yarrowia lipolytica

La cepa Y4184U de Y. lipolytica se utilizó como anfitriona en los Ejemplos 32, 33, 34 y 51, infra. La cepa Y4184U se obtuvo de Y. lipolytica ATCC #20362, y es capaz de producir aproximadamente el 31% de EPA con relación a los lípidos totales a través de la expresión de una vía delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa

El desarrollo de la cepa Y4184U requiere la construcción de la cepa Y2224, de la cepa Y4001, de la cepa Y4001U, de la cepa Y4036, de la cepa Y4036U y de la cepa Y4069 (supra). Un desarrollo adicional de la cepa Y4184U (en el diagrama de la FIG. 51A) requiere la construcción de la cepa Y4084 (que produce el 14% de EPA), de la cepa Y4084U1 (Ura-), de la cepa Y4127 (que produce el 18% de EPA), de la cepa Y4127U2 (Ura-), de la cepa Y4158 (que produce 25% de EPA), de la cepa Y4158U1 (Ura-), y de la cepa 4184 (que produce el 30,7% de EPA). Aunque los detalles relativos a la transformación y selección de las cepas productoras de EPA desarrolladas después de la cepa Y4069 no se elaborarán en el presente documento, la metodología utilizada para el aislamiento de la cepa Y4084, de la cepa Y4084U1, de la cepa Y4127, de la Y4127U2, de la cepa Y4158, de la cepa Y4158U1, de la cepa Y4184 y de la cepa Y4184U se describió durante la construcción de la cepa Y4305, supra.

En pocas palabras, el constructo pZP3-Pa777U (FIG. 47A; ID de SEC Nº: 338) se utilizó para integrar tres genes delta-17 desaturasa en los loci POX3 (Nº AJ001301 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4069, dando como resultado de ese modo el aislamiento de la cepa Y4084 (que produce 14% EPA). La cepa Y4084U1 se creó por la expresión temporal de la enzima recombinasa Cre en el constructo pY117 (FIG. 47B; ID de SEC Nº: 343) dentro de la cepa Y4084 para producir un fenotipo Ura-. El constructo pZP2-2988 (FIG. 48A; ID de SEC Nº: 345) se utilizó a continuación para integrar un gen delta-12 desaturasa, dos genes delta-8 desaturasa y un gen delta-9 elongasa en los loci Pox2 (Nº AJ001300 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4084U1, dando de ese modo como resultado el aislamiento de la cepa Y4127 (que produce 18% de EPA). La cepa Y4127 de Yarrowia lipolytica se depositó en la American Type Culture Collection el 29 de noviembre de 2007 y lleva la designación ATCC PTA-8802.

La cepa Y4127U2 se creó mediante la interrupción del gen Ura3 en la cepa Y4127 a través del constructo pZKUE3S (FIG. 48B; ID de SEC Nº: 351), que comprende un gen quimérico EXP1::ME3S::Pex20 específico del gen Ura3. El constructo pZKL1-2SP98C (FIG. 49B; ID de SEC Nº: 352) se utilizó para integrar un gen delta-9 elongasa, un gen delta-8 desaturasa, un gen delta-12 desaturasa y un gen diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT1) de Yarrowia lipolytica en los loci Lip1 (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4127U2, dando de ese modo como resultado el aislamiento de la cepa Y4158 (que produce 25% EPA). Un derivado Ura- (es decir, la cepa Y4158U1) se creó después, a través de la transformación con el constructor pZKUE3S (FIG. 48B; ID de SEC Nº: 351), que comprende un gen quimérico EXP1::ME3S::Pex20 apuntado hacia el gen Ura3. Por último, el constructor pZKL2-5U89GC (FIG. 49A; ID de SEC Nº: 348) se utilizó para integrar un gen delta-9 elongasa, un gen delta-8 desaturasa, una delta-5 desaturasa, y un CPT1 de Yarrowia lipolytica en los loci Lip2 (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes) de Y4158U1, dando de ese modo como resultado el aislamiento de la cepa Y4184.

El perfil de lípidos completo de la cepa Y4184 es el siguiente: 16:0 (3,1%), 16:1 (1,5%), 18:0 (1,8%), 18:1 (8,7%), 18:2 (31,5%), ALA (4,9%), EDA (5,6%), DGLA (2,9%), ARA (0,6%), ETA (2,4%) y EPA (28,9%). El peso de células secas (dcw) en los lípidos totales era de 23,9%.

El genotipo final de la cepa Y4184 con respecto al tipo silvestre Yarrowia ATCC lipolytica #20362 era desconocido 1-, desconocido 2-, desconocido 4-, desconocido 5-, desconocido 6-, desconocido 7-, YAT1::ME3S::Pex16, EXP1::ME3S::Pex20 (2 copias), GPAT::EgD9e::Lip2, FBAINm::EgD9eS::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip1, FBA::EgD9eS::Pex20, YAT1::EgD9eS::Lip2, GPD::EgD9eS::Lip2, GPDIN::EgD8M::Lip1, YAT1::EgD8M::Aco, EXP1::EgD8M::Pex16, FBAINm::EgD8M::Pex20, FBAIN::EgD8M::Lip1 (2 copias), GPM/FBAIN::FmD12S::Oct, EXP1::FmD12S::Aco, YAT1::FmD12::Oct, GPD::FmD12::Pex20, EXP1::EgD5S::Pex20, YAT1::EgD5S::Aco, YAT1::Rd5S::Oct, FBAIN::EgD5::Aco, FBAINm::PaD17::Aco, EXP1::PaD17::Pex16, YAT1::PaD17S::Lip1, YAT1::YlCPT1::Aco, GPD::YlCPT1::Aco.

Con el fin de interrumpir el gen Ura3 en la cepa Y4184, el constructor pZKUM (FIG. 50A; ID de SEC Nº: 353) se utilizó para integrar un gen mutante Ura3 en el gen Ura3 de la cepa Y4184.

Se recogieron un total de 11 transformantes cultivados en placas MM+5-FOA y se volvieron a rayar en placas de MM y en placas de MM+5-FOA, por separado. Todas las 11 cepas tenían un fenotipo Ura- (es decir, las células podrían crecer en placas de MM+5-FOA, pero no en las placas de MM). Las células se rasparon de las placas de MM+5-FOA, se extrajeron los lípidos; y los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por transesterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron la presencia de 11,2%, 10,6%, y 15,5% de EPA en los transformantes #7, #8 y #10 con pZKUM cultivado en placas MM+5-FOA. Estas tres cepas fueron designadas como cepas Y4184U1, Y4184U2 e Y4184U4, respectivamente (colectivamente, Y4184U).

Ejemplo 1

Condiciones de cultivo de Euglena gracilis, perfil de lípidos y aislamiento del ARNm

La Euglena gracilis se obtuvo en el laboratorio del Dr. Richard Triemer en la Universidad del Estado de Michigan (East Lansing, MI). A partir de 10 ml de cultivo en fase de crecimiento activo, se transfirió una alícuota de 1 ml a 250 ml de Medio Euglena gracilis (Eg) en una botella de vidrio de 500 ml. El medio de Eg se elaboró combinando 1 g de acetato de sodio, 1 g de extracto de carne (Nº U126-01 del Cat., Difco Laboratories, Detroit, MI), 2 g de triptona Bacto® (0123-17-3, Difco Laboratories), y 2 g de extracto de levadura Bacto® (Nº 0127-17-9 del Cat., Difco Laboratories) en 970 ml de agua. Después de esterilizar el filtro, se añadieron asépticamente 30 ml de sobrenadante del suelo-agua (Nº 15-3790 del Cat., Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC) para producir el medio Eg final. Los cultivos de Euglena gracilis fueron cultivados a 23ºC con un ciclo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad durante 2 semanas sin agitación.

Después de 2 semanas, se extrajeron 10 ml de cultivo para el análisis de lípidos y se centrifugaron a 1.800 x g durante 5 min. El sedimento se lavó una vez con agua y se volvió a centrifugar. El sedimento resultante se secó durante 5 min al vacío, se volvió a suspender en 100 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación. Después de esto, se añadieron 0,5 ml de hexano, y los viales se incubaron durante 15 Minutos a temperatura ambiente con agitación. Se separaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados desde la capa de hexano) y se cuantificaron utilizando un Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Nº 24152 del Cat). La temperatura del horno se programó manteniendo a 220ºC durante 2,7 min, aumentando hasta 240ºC a 20ºC/min, y después manteniendo durante 2,3 min adicionales. El gas portador fue suministrado por un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los patrones comercialmente disponibles (Nu-Chek Prep, Inc. Nº T-99-A de Cat), y el cromatograma resultante se muestra en la FIG. 27.

El cultivo restante de 2 semanas (240 ml) se sedimentó por centrifugación a 1.800 x g durante 10 Minutos, se lavó una vez con agua, y se volvió a centrifugar. El ARN total se extrajo a partir del sedimento resultante utilizando el ARN reactivo STAT-60® de ARN (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX) y según el protocolo proporcionado por el fabricante (úsense 5 ml de reactivo, ARN disuelto en 0,5 ml de agua). De esta forma, se obtuvo 1 mg de ARN total (2 mg/ml) a partir del sedimento. El ARNm se aisló a partir de 1 mg de ARN total utilizando el Kit de Purificación de ARNm (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) según protocolo proporcionado por el fabricante. De esta forma, se obtuvieron 85 g de ARNm.

Ejemplo 2

Síntesis de ADNc de Euglena gracilis, construcción de la genoteca y secuenciación

Una genoteca de ADNc se generó utilizando el Kit de Construcción de Genoteca de ADNc Cloneminer® (Nº 18249-029 del Cat., Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (versión B, 25-0608). Utilizando un procedimiento sin radiomarcado, se sintetizó ADNc a partir de 3,2 g de ARNm (descrito anteriormente) utilizando el cebador Biotin-attB2-oligo (dT). Después de la síntesis de la primera y segunda cadena, se añadió el adaptador attB1; se realizó la ligadura; y el ADNc se fraccionó por tamaños mediante cromatografía de columna. ADN de las fracciones 7 y 8 (tamaño que varia de ~ 800-1.500 pb) se concentraron, se recombinaron en pDONR® 222, y se transformaron en células resistentes al fago T1 ElectroMAX® DH10B® de E. coli (Invitrogen Corporation). La genoteca de Euglena gracilis se denominó eeg1c.

Para la secuenciación, primero se recuperaron clones a partir de cultivos de glicerol archivados en fase de crecimiento/congelados en placas de medios refrigerados de 384 pocillos. Utilizando un recolector de colonias QPix automático (Genetix), las células fueron recolectadas y después se utilizaron para inocular placas de pocillos profundos de 96 pocillos que contenían LB+50 µg/ml de kanamicina. Después de crecer 20 h a 37ºC, las células se sedimentaron por centrifugación y se almacenaron a -20ºC. Los plásmidos se aislaron a continuación, en un robot Eppendorf5Prime, utilizando un procedimiento modificado miniprep de lisis alcalina en formato de 96 pocillos (Eppendorf Perfectprep). En pocas palabras, para facilitar la eliminación de los restos celulares después de la precipitacion de acetato se utilizaron un filtro y un colector de vacío. El ADN plásmido era después ligado a una segunda placa de filtro directamente desde el filtrado, lavado, secado y eluido.

Los plásmidos fueron secuenciados en su extremo en placas de 384 pocillos, utilizando el cebador Universal M13F para el cebado del vector (ID de SEC Nº: 1) y el kit de secuenciación ABI BigDye versión 3 Prism. Para la reacción de secuenciación, se usaron 100-200 ng de molde y 6,4 pmol de cebador, y las siguientes condiciones de reacción se repitieron 25 veces: 96ºC durante 10 s, 50ºC durante 5 s y 60ºC durante 4 min. Después de la limpieza basada en etanol, los productos de reacción de secuenciación del ciclo se resolvieron y se detectaron en secuenciadores automáticos Perkin-Elmer ABI 3700.

Ejemplo 3

Identificación de homólogos de enzimas de elongación de los PUFA-C20 a partir de eeg1c de la biblioteca de ADNc de Euglena gracilis

Los clones de ADNc que codifican homólogos de enzimas de elongación PUFA-C20 (es decir, "C20 PUFA Elo") se identificaron mediante la realización de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Biol. Mol. 215: 403-410 (1993)) por similitud con secuencias contenidas en la base de datos “nr” BLAST (que comprende todas las traducciones no redundantes CDS del Banco de Genes, secuencias derivadas de la estructura tridimensional del Banco de Datos de proteínas Brookhaven, la última versión principal de la base de datos de secuencias de proteínas SWISS-PROT, y las bases de datos EMBL y DDBJ). Las Secuencias de ADNc obtenidas en el Ejemplo 2 se analizaron por La similitud con todas las secuencias de ADN disponibles públicamente contenidas en la base de datos "nr" utilizando el algoritmo BLASTN proporcionado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de ADN fueron traducida en todos los marcos de lectura y comparadas por similitud con todas las secuencias de proteínas disponibles públicamente contenidas en la base de datos "nr" utilizando el algoritmo BLASTX (Gish y States, Nat. Genet 3: 266-272 (1993)), proporcionado por el NCBI. Por conveniencia, el valor P (probabilidad) de observar una coincidencia de una secuencia de ADNc con una secuencia contenida en la base de datos buscada simplemente por casualidad como calculada mediante BLAST son informadas en el presente documento como valores “pLog”, que representan el negativo del logaritmo del valor P informado. En consecuencia, cuanto mayor sea el valor pLog, mayor será la probabilidad de que la secuencia de ADNc y el “hito” BLAST representen proteínas homólogas.

La búsqueda BLASTX utilizando las secuencias de nucleótidos del clon eeg1c.pk005.p14.f reveló similitud de la proteína codificada por el ADNc con la CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2) de Pavlova sp. (Nº AAV33630 de acceso al NCBI (GI 54307108), locus AAV33630, CDS AY630573; Pereira et al., Biochem. J. 384: 357-366 (2004)). La secuencia de una porción del inserto de ADNc a partir del clon eeg1c.pk005.p14.f se muestra en la ID de SEC Nº: 3 (extremo 5' del inserto de ADNc). Posteriormente, se obtuvo la secuencia del inserto completo (es decir, eeg1c.pk005.p14.f:fis) y se muestra en la ID de SEC Nº: 4. La secuencia para la secuencia de codificación (CDS) se muestra en la ID de SEC Nº: 5. La secuencia para la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente se muestra en la ID de SEC Nº: 6.

La secuenciación del inserto completo (FIS) se llevó a cabo utilizando un protocolo de transposición modificado. Los clones identificados por la FIS fueron recuperados de las existencias de glicerol archivadas como colonias individuales y el ADN plásmido se aisló mediante lisis alcalina. Moldes de plásmido se transposaron mediante el kit de transposición del Sistema de Generación de Moldes (TGS II) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), según el protocolo del fabricante. El ADN transpuesto se transformó en células electro-competentes EH 10B (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) mediante electroporación. Múltiples transformantes fueron seleccionados al azar de cada reacción de transposición, se preparó ADN plásmido, y los moldes se secuenciaron como anteriormente (ABI BigDye v3.1) hacia el exterior del sitio del caso de transposición, utilizando solo cebadores SeqE (ID de SEC Nº: 7) y SeqW (ID de SEC Nº: 8).

La secuencia de datos se recogió (software ABI Prism Collections) y se montó utilizando el programa de montaje de secuencias Phrap (P. Green, Universidad de Washington, Seattle). Los conjuntos fueron visualizados por el redactor de secuencias Consed (D. Gordon, Universidad de Washington, Seattle) para la edición final.

La secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 6 se evaluó mediante BLASTP, produciendo un valor de pLog de 61,22 (valor E de 6E-62) frente a la CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº 2) de Pavlova sp.. La secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 6 es 45,1% idéntica a la secuencia CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2) de Pavlova sp. utilizando el procedimiento Jotun Hein. Los cálculos del porcentaje de identidad de secuencias realizadas por el procedimiento de Jotun Hein (Hein, J.J., Meth Enz 183: 626-645 (1990)) se realizaron utilizando el programa MegAlign® v6.1 de la suite de cálculos bioinformáticas LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI) con los parámetros por defecto para el alineamiento por parejas (KTUPLE = 2). La secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 6 es 40,4% idéntica a la secuencia CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2) de Pavlova sp. utilizando el procedimiento Clustal V. Los cálculos del porcentaje de identidad de las secuencias llevados a cabo por el procedimiento Clustal V (Higgins, D.G. y Sharp, P.M., Comput. Appl. Biosci. 5: 151-153 (1989); Higgins et al., Comput. Appl. Biosci. 8: 189-191 (1992)) se realizaron utilizando el programa MegAlign® v6.1 de la suite de cálculos bioinformáticos LASERGENE (supra) con los parámetros por defecto para el alineamiento por parejas (KTUPLE = 1, PENALIZACIÓN POR ESPACIO= 3, VENTANA = 5 y diagonales GUARDADO = 5 y PENALIZACION POR LONGITUD DEL ESPACIO = 10). Los resultados y las probabilidades BLAST indican que el fragmento de ácido nucleico presente (ID de SEC Nº: 5) codifica un gen C20-PUFA Elo de Euglena gracilis completo, en el presente documento denominado EgC20elo1.

La FIG. 25 compendia los valores BLASTP y el porcentaje identidad de EgC20elo1 (Ejemplo 3), EgDHAsyn1 (Ejemplo 4, infra) y EgDHAsyn2 (Ejemplo 5, infra).

Ejemplo 4

Identificación de sintasa 1 de DHA (EgDHAsyn1) a partir de eeg1c de la biblioteca de ADNc de Euglena gracilis

Los clones ADNc que codifican homólogos C20-PUFA Elo adicionales fueron identificados mediante la realización de búsquedas BLAST de similitud con las secuencias contenidas en la base de datos "nr" BLAST como se describe en el Ejemplo 3.

La búsqueda BLASTX utilizando las secuencias de nucleótidos del clon eeg1c.pk016.e6.f (también denominado pKR1049) reveló similitud de la proteína codificada por el ADNc con la CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2) de Pavlova sp. (Nº AAV33630 de acceso al NCBI (GI 54307108), locus AAV33630, CDS AY630573; Pereira et al., Biochem. J. 384: 357-366 (2004)). La secuencia de una porción del inserto de ADNc a partir del clon eeg1c.pk016.e6.f se muestra en la ID de SEC Nº: 9 (extremo 5' del inserto de ADNc). Posteriormente, la secuencia del inserto completo (eeg1c.pk016.e6.f:fis) se obtuvo como se describe en el Ejemplo 3 y se muestra en la ID de SEC Nº: 10. La secuencia de codificación se muestra en la ID de SEC Nº: 11; la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente se muestra en ID de SEC Nº: 12.

La secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 12 se evaluó mediante BLASTP como se describe en el Ejemplo 3. Curiosamente, se encontró que la ID de SEC Nº: 12 era similar tanto a C20-PUFA Elo como a delta-4 desaturasa de ácido graso. El N-término de la ID de SEC Nº: 12 (desde aproximadamente 16-268 aminoácidos) produce un valor pLog de 60,30 (valor E de 5E-61; 124/258 aminoácidos idénticos; 48% de identidad) frente a CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2) de Pavlova sp.. El C-término de la ID de SEC Nº: 12 (desde aproximadamente 253-793 aminoácidos) produce un valor E de 0,0 (535/541 aminoácidos idénticos; 98% de identidad), frente a la delta-4 desaturasa de ácido graso Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13) (Nº AAQ19605 de acceso al NCBI (GI 33466346), locus AAQ19605, CDS AY278558; Meyer et al., Biochemistry 42 (32): 9779-9788 (2003)). Los resultados y las probabilidades BLAST indican que el fragmento de ácido nucleico presente (ID de SEC Nº: 11) codifica una fusión génica Euglena gracilis C20-PUFA Elo/delta-4 desaturasa de ácido graso completo, en el presente documento denominado Euglena gracilis DHA sintasa 1 (EgDHAsyn1).

La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) es un 47,8% idéntica a la C20-PUFA Elo de Pavlova sp. CCMP459 (ID de SEC Nº: 2) y un 98,9% idéntica a la delta-4 desaturasa de ácido graso de Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13), utilizando el procedimiento de Jotun Hein como se describe en el Ejemplo 3. La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) es un 41,2% idéntica a la C20-PUFA Elo de Pavlova sp. CCMP459 (ID de SEC Nº: 2) y un 98,9% idéntica a la delta-4 desaturasa de ácido graso Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13), utilizando el procedimiento Clustal V como se describe en el Ejemplo 3.

La FIG. 27 compendia los valores BLASTP y porcentaje de identidad para EgDHAsyn1 (Ejemplo 4), EgC20elo1 (Ejemplo 3, supra) y EgDHAsyn2 (Ejemplo 5, infra).

Ejemplo 5

Identificación de sintasa 2 de DHA (EgDHAsyn2) a partir de eeg1c de la biblioteca de ADNc de Euglena gracilis

Aproximadamente 17.000 clones del eeg1c de la biblioteca de ADNc de Euglena gracilis se sembraron en tres grandes placas de Petri cuadradas (24 cm x 24 cm) (Corning, Corning, NY) conteniendo cada una medio de LB+50 μg/ml de agar kanamicina. Las células se cultivaron durante la noche a 37ºC, y las placas eran después enfriadas a temperatura ambiente.

Levantamiento de las colonias:

Membrana Biodyne B de 0,45 μm (Nº 60207 de Cat., Pall Corporation, Pensacola, FL) se recortó a aproximadamente 22 cm x 22 cm, y la membrana se colocó cuidadosamente en la parte superior del agar para evitar las burbujas de aire. Después de incubación durante 2 min a temperatura ambiente, la membrana se marcó para orientación, se despegó con unas pinzas, y se colocó del lado de las colonias sobre papel de filtro empapado con 0,5 M de hidróxido de sodio y cloruro de sodio 1:5 M. Después de desnaturalizar durante 4 min, el hidróxido de sodio se neutralizó colocando la membrana sobre papel de filtro empapado con 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) y cloruro de sodio 1,5 M durante 4 min. Este paso se repitió, y la membrana se enjuagó brevemente en tampón 2X SSC (20X SSC es cloruro de sodio 3M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0) y se seco al aire sobre papel de filtro

Hibridación:

Las membranas se hibridaron previamente a 65ºC en 200 ml de solución de hibridación durante 2 horas. La solución de hibridación contenía 6X SSPE (20X SSPE es cloruro de sodio 3 M, fosfato sódico 0,2 M, AEDT 20 mM, pH 7,4), 5X reactivo de Denhardt (reactivo de Denhardt 100X es 2% (peso/vol) de Ficoll, 2% (peso/vol) de polivinilpirrolidona, 2% (peso/vol) albúmina de suero bovino acetilado), 0,5% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 100 μg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado, y 5% de sulfato de dextrano.

Una sonda de ADN se realizó utilizando un fragmento de ADN NcoI/NotI purificado en gel de agarosa, que contiene EgDHAsyn1*, de pY141 (descrito en el Ejemplo 10 en el presente documento) etiquetado con dCTP P^{32} utilizando el Sistema de Etiquetado de ADN RadPrime (Nº 18428-011 de Cat., Invitrogen, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante. El dCTP P^{32} no incorporado se separó utilizando una columna NICK (Nº 17-0855-02 de Cat., Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), según las instrucciones del fabricante. La sonda se desnaturalizó durante 5 min a 100ºC y se colocó en hielo durante 3 min; a continuación, se añadió medio para la solución de hibridación.

La membrana se hibridó con la sonda durante la noche a 65ºC con agitación suave y después se lavaron al día siguiente dos veces con 2X SSC que contiene SDS al 0,5% (5 min cada uno) y dos veces con 0,2X SSC que contiene 0,1% de SDS (15 min cada uno). Después del lavado, el hiperfilm (Nº RPN30K de Cat., Amersham Biosciences) fue expuesto a la membrana durante la noche a -80ºC.

Basado en el alineamiento de las placas con el hiperfilm expuesto, las colonias positivas se recogieron utilizando el extremo romo de una pipeta Pasteur en 1 ml de agua y después se agitaron con vórtice. Varias diluciones se hicieron y se sembraron en pequeñas placas de Petri redondas (82 mm) que contenían medio LB mas 50 μg/ml de kanamicina para obtener aproximadamente 100 colonias bien aisladas en una sola placa. Los capas se realizaron como se describió anteriormente, excepto que se usaron círculos de membrana NytranN (Nº 10416116 de Cat., Schleicher y Schuell, Keene, NH), y la hibridación se llevó a cabo en 100 ml utilizando la sonda radiomarcada restante. De esta forma, se identificaba un clon positivo (designado eeg1c-1). El plásmido de eeg1c-1 puede también denominarse pLF116.

El clon positivo individual se cultivó a 37ºC en medios líquidos de LB+50 μg/ml de kanamicina, y el plásmido se purificó utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA) según el protocolo sanitario del fabricante. El inserto plásmido fue secuenciado como se describe en el Ejemplo 2, con el kit de secuenciación ABI BigDye versión 3 Prism utilizando el cebador Universal M13F para el cebado del vector (ID de SEC Nº: 1), el vector cebado con cebador M13rev (ID de SEC Nº: 14), y los oligonucleótidos WobbleT cebados en la cola poli(A). En pocas palabras, el cebador WobbleT es una mezcla equimolar de 21 meros de poli(T)A, poli(T)C, y poli(T)G, que se utilizó para secuenciar el extremo 3' de los clones de ADNc. Basado en los datos de secuencia inicial, la secuencia de fragmento interno adicional se obtuvo de una forma similar utilizando oligonucleótidos oEUGel4-1 (ID de SEC Nº: 15), EgEloD4Mut-5 (ID de SEC Nº: 16), oEUGel4-2 (ID de SEC Nº: 17), EgDHAsyn5' (ID de SEC Nº: 18) y EgDHAsyn3' (ID de SEC Nº: 19) De esta forma, se obtuvo la secuencia de inserto completo de eeg1c-1 y se muestra en la ID de SEC Nº: 20. La secuencia de codificación se muestra como ID de SEC Nº: 21, mientras que la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente se muestra como ID de SEC Nº: 22.

La secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 22 se evaluó mediante BLASTP como se describe en el Ejemplo 3. Como en el caso de EgDHAsyn1, se encontró que la ID de SEC Nº: 22 también era similar tanto a C20-PUFA Elo como a delta-4 desaturasa de ácido graso. El N-término de la ID de SEC Nº: 22 (desde aproximadamente 41-268 aminoácidos) produce un valor de PLOG de 61,0 (valor E de 1e-61; 118/231 aminoácidos idénticos; 51% de identidad) frente al Pavlova sp. CCMP459 C20-PUFA ElO (ID de SEC Nº: 2). El C-término de ID de SEC Nº: 22 (desde aproximadamente 253-793 aminoácidos) produce un valor E de 0,0 (541/541 aminoácidos idénticos; 100% de identidad), en comparación con la secuencia de aminoácidos de delta-4 desaturasa de ácido graso Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13). Los resultados y las probabilidades BLAST indican que el fragmento de ácido nucleico presente (ID de SEC Nº: 21) codifica una fusión génica completo Euglena gracilis C20-PUFA Elo/delta-4 desaturasa de ácido graso, en el presente documento denominado Euglena gracilis DHA sintasa 2 (EgDHAsyn2).

La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) es 48,2% idéntica a la C20-PUFA Elo de Pavlova sp. CCMP459 (ID de SEC Nº: 2) y 100% idéntica a la delta-4 desaturasa de ácido graso Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13), utilizando el procedimiento de Jotun Hein como se describe en el Ejemplo 3. La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) es 41,2% idéntica a la C20. PUFA Elo de Pavlova sp. CCMP459 (ID de SEC Nº: 2) y 100% idéntica a la delta-4 desaturasa de ácido graso Euglena gracilis (ID de SEC Nº: 13), utilizando el procedimiento Clustal V como se describe en el Ejemplo 3.

La FIG. 25 compendia los valores BLASTP y porcentajes de identidad para EgDHAsyn2 (Ejemplo 5), EgC20elo1 (Ejemplo 3, supra) y EgDHAsyn1 (Ejemplo 4, supra).

Ejemplo 6

Análisis de la estructura primaria de EgC20elo1, EgDHAsyn1 y EgDHAsyn2

Dada la identidad de aminoácidos 100% entre el C-término de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) y la Euglena gracilis delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 13), se llevó a cabo una alineamiento de secuencias de nucleótidos entre la secuencia de codificación de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 21), la secuencia de ADNc de la Euglena gracilis delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 23) (Nº AY278558 de acceso al NCBI (GI 33466345), locus AY278558, Meyer et al., Biochemistry 42(32): 9779-9788 (2003)), y la secuencia de codificación de Euglena gracilis delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 24) (Meyer et al., supra). La secuencia del alineamiento se realizó por el procedimiento Clustal W (utilizando el programa MegAlign® v6.1 de la suite de cálculos bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR Inc) con los parámetros de alineamiento múltiple por defecto (PENALIZACIÓN POR ESPACIO = 10, PENALIZACIÓN POR

EXTENSIÓN DEL ESPACIO = 0,2, Secuencias Divergentes de Retraso SEQs (%) = 30, Peso de Transiciones de ADN = 0,5, Matriz de Pesos de proteínas = serie Gonnet, Matriz de Peso de ADN = IUB). El alineamiento se muestra en la FIG. 2. La secuencia de codificación Euglena gracilis delta-4 desaturasa se denomina EgD4_CDS (ID de SEC Nº: 24); la secuencia de ADNc Euglena gracilis delta-4 desaturasa se denomina EgD4_ADNc (ID de SEC Nº: 23); y la secuencia de codificación sintasa 2 de DHA Euglena gracilis se denomina EgDHAsyn2_CDS (ID de SEC Nº: 21).

El extremo 5' (donde las secuencias son divergentes) y el extremo 3' (donde las secuencias son idénticas) del alineamiento están truncados con el fin de adaptarse al alineamiento en una página. La FIG. 2 Ilustra que las Secuencias son muy divergentes desde el inicio de la Euglena gracilis delta-4 desaturasa ADNc hasta el sitio de inicio del pb 83 secuencia arriba de la secuencia de codificación (CDS). Del alineamiento se deduce que las secuencias de nucleótidos para EgD4_ADNc y EgDHAsyn2_CDS son idénticas a partir del pb 83 secuencia arriba del sitio de iniciación de la CDS de la secuencia de ADNc de Euglena gracilis delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 23), que es equivalente al nucleótido 674 de la EgDHAsyn2_CDS (ID de SEC Nº: 21), a través del extremo de las secuencias. En el punto exacto de divergencia, un sitio NotI se puede encontrar en la secuencia de ADNc de Euglena gracilis (nucleótidos 656-663 de la ID de SEC Nº: 23), y dado que los enlazadores NotI se utilizaron en la clonación original de la Euglena gracilis delta-4 desaturasa ADNc (véase Meyer et al., supra), es probable lo que era clonado era un transcrito incompleto, de longitud no total, para EgDHAsyn2.

La secuencia de aminoácidos EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) se comparó con EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) y EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6) utilizando el procedimiento Clustal W como se describió anteriormente, y el alineamiento se muestra en las FIG. 3A y 3B. En comparación con EgDHAsyn1 y EgDHAsyn2, EgC20elo1 tiene una eliminación de 7 aminoácidos (es decir, A L D L A [V/I] L) y sustituciones de otros 2 aminoácidos (es decir, W47R, T48I; basado en la numeración para EgDHAsyn1) en el extremo N-término. Después de 289 aminoácidos de EgC20elo1, las secuencias son muy diferentes en comparación con las sintasas de DHA. EgDHAsyn1 y EgDHAsyn2 tienen 498 aminoácidos adicionales en sus extremos C-término con homología con delta-4 desaturasas de ácidos grasos, mientras que EgC20elo1 termina después de solo 9 aminoácidos adicionales. Las secuencias de aminoácidos de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) tienen 8 diferencias de aminoácidos entre las 2 secuencias (es decir, V25I, G54V, A305T, L310P, V380I, S491 N, I744T, R747P; basado en la numeración para EgDHAsyn1). Las últimas cuatro diferencias aparecen en el dominio la delta-4 desaturasa.

Las FIG. 4A y 4B el Clustal W muestran el alineamiento del N-término de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y el N-término de EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22) con EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6), Pavlova. sp. CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2), elongasa 2 de PUFA Ostreococcus tauri (ID de SEC Nº: 25) (Nº AAV67798 de acceso al NCBI (GI 55852396), locus AAV67798, CDS AY591336; Meyer et al., J. Lipid Res 45(10): 1899-1909 (2004)), y elongasa 2 de PUFA Thalassiosira pseudonana (ID de SEC Nº: 26) (Nº AAV67800 de acceso al NCBI (GI 55.852.441), locus AAV67800, CDS AY591338; Meyer et al., J. Lipid Res, supra). En las FIG. 4A y 4B, las proteínas Pavlova, Ostreococcus y Thalassiosira son etiquetadas como PavC20elo, OtPUFAelo2, y TpPUFAelo2, respectivamente.

Las FIG.5A, 5B, 5C y 5D muestran el alineamiento Clustal W del C-término de EgDHAsyn1 (EgDHAsyn1_CT; aminoácidos 253-793 de la ID de SEC Nº: 12; el N-término de EgDHAsyn1 no se muestra y se indica mediante "... ") y el C-término de EgDHAsyn2 (EgDHAsyn2_CT; aminoácidos 253-793 de la ID de SEC Nº: 22, el N-término EgDHAsyn2 no se muestra y se indica mediante "... ") con Euglena gracilis delta-4 desaturasa de ácido graso (ID de SEC Nº: 13), Thraustochytrium aureum delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 27) (Nº AAN75707 de acceso al NCBI (GI 25956288), locus AAN75707, CDS AF391543), Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 28) (publicación PCT Nº WO 2002/090493), Thalassiosira pseudonana delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 29) (Nº AAX14506 de acceso al NCBI (GI 60173017), locus AAX14506, CDS AY817156; Tonon et al., FEBS J. 272(13): 3401-3412 (2005)), y Isochrysis galbana delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 30) (Nº AAV33631 de acceso al NCBI (GI 54307110), locus AAV33631, CDS AY630574; Pereira et al., Biochem. J. 384(2): 357-366 (2004) y la publicación PCT Nº WO 2002/090493). En las FIG. 5A, 5B, 5C y 5D, las proteínas Euglena, Thraustochytrium, Thalassiosira e Isochrysis son etiquetadas como EgD4, TaD4, TpD4 e IgD4, respectivamente.

La FIG. 6 muestra un alineamiento de los fragmentos interiores de EgDHAsyn1 (etiquetada como "EgDHAsyn1_NCT.pro"; aminoácidos 253-365 de la ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (etiquetada como "EgDHAsyn2_NCT.pro"; aminoácidos 253-365 de la ID de SEC Nº: 22), que abarca tanto la región elongasa C20 como el dominio delta-4 desaturasa (basado en la homología), con los C-términos de elongasas C20 (EgC20elo1_CT.pro, aminoácidos 246-298 de la ID de SEC Nº: 6; PavC20elo_CT.pro, aminoácidos 240-277 de la ID de SEC Nº: 2; OtPUFAelo2_CT.pro, aminoácidos 256-300 de la ID de SEC Nº: 25; TpPUFAelo2_CT.pro, aminoácidos 279-358 de la ID de SEC Nº: 26) y se muestran los N-términos de delta-4 desaturasas (EgD4_NT.pro, aminoácidos 1-116 de la ID de SEC Nº: 13; TaD4_NT.pro, aminoácidos 1-47 de la ID de SEC Nº: 27; SaD4_NT.pro, aminoácidos 1-47 de la ID de SEC Nº: 28; TpD4_NT.pro, aminoácidos 1-82 de la ID de SEC Nº: 29; IgD4_NT.pro, aminoácidos 1-43 de la ID de SEC Nº: 30). Un motivo conservado en el C-término de todos los dominios de elongasa C20 (es decir, VLFXXFYXXXY (ID de SEC Nº: 180)) está también presente en el N-término EgD4 y soporta además EgD4 que es una sintasa DHA incompleta.

En el C-término del dominio elongasa C20 para cada EgDHAsyn1, EgDHAsyn2, y EgC20elo1, hay una secuencia repetida que contiene un motivo NG (es decir, KNGK (ID de SEC Nº: 186), PENGA (ID de SEC Nº: 187), PENGA (ID

de SEC Nº: 187) y PCENGTV (ID de SEC Nº: 191); denominada repeticiones NG e indicada en FIG. 6 con líneas bajo la secuencia). Aunque el patrón se produce con una alta probabilidad de ocurrencia, una exploración de la región repetido NG utilizando Prosite muestra el último motivo NG (es decir, NGTV) en esta región como un sitio potencial de N-glicosilación. Después de la región de repetición NG, tanto EgDHAsyn1 como EgDHAsyn2 contienen una región rica en prolina (etiquetada "Enlazador rico en prolina" en la FIG. 6), que puede actuar como un enlazador entre los dominios elongasa C20 y delta-4 desaturasa. El enlazador puede desempeñar el papel de mantener los dominios de elongasa C20 y delta-4 desaturasa en la orientación estructural adecuada para permitir la transformación eficiente de EPA a DHA. Aunque el enlazador rico en prolina se muestra en la FIG. 6 como que se extiende desde P304 a V321 (basado en la numeración para EgDHAsyn1), la región de repetición NG es también algo rico en prolina y puede también desempeñar un papel en esta función enlazadora.

El nucleótido y las secuencias de aminoácidos correspondientes para el enlazador rico en prolina de EgDHAsyn1, como se define en la FIG. 6, se exponen en la ID de SEC Nº: 197 y en la ID de SEC Nº: 198, respectivamente. El nucleótido y las secuencias de aminoácidos correspondientes para el enlazador rico en prolina de EgDHAsyn2, como se define en la FIG. 6, se exponen en la ID de SEC Nº: 199 y en la ID de SEC Nº: 200, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de los aminoácidos correspondientes del dominio elongasa C20 EgDHAsyn1 a partir de EgOHAsyn1 se exponen en la ID de SEC Nº: 201 y en la ID de SEC Nº: 202, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de los aminoácidos correspondientes del dominio elongasa C20 EgDHAsyn2 se exponen en la ID de SEC Nº: 203 y en la ID de SEC Nº: 204, respectivamente.

Ejemplo 7

Construcción de pDMW263

El plásmido pY5-30 (que fue descrito previamente en la patente de EE.UU. 7.259.255) es un plásmido lanzadera que puede replicarse tanto en E. coli como en Yarrowia lipolytica. El plásmido pY5-30 contiene lo siguiente: una secuencia de replicación autónoma Yarrowia (ARS18); un plásmido ColE1 origen de replicación; un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), para la selección en E. coli; un gen LIEU2 Yarrowia, para La selección en Yarrowia; y un gen quimérico GUS::TEF::XPR. El plásmido pDMW263 (ID de SEC Nº: 31) se creó a partir de pY5-30, reemplazando el promotor TEF con el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (patente de EE.UU. 7.202.356), utilizando técnicas bien conocidas para un experto en la técnica. En pocas palabras, el promotor FBAIN está situado en la región no traducida 5' secuencia arriba enfrente del codón "ATG" de iniciación de la traducción de la enzima bifosfato aldolasa-fructosa (CE 4.1.2.13), codificada por el gen fba1. Este promotor es necesario para expresión e incluye una porción de región de codificación 5' que tiene un intrón. El promotor modificado, FBAINm tiene una eliminación de 52 pb entre el codón ATG de iniciación de la traducción y el intrón del promotor FBAIN (incluyendo de ese modo solo 22 aminoácidos del N-término) y un nuevo motivo de consenso de traducción después del intrón. La Tabla 20 compendia los componentes de pDMW263 (ID de SEC Nº: 31; también descritos en la publicación PCT Nº WO 2007/061845).

Tabla 20

Componentes del plásmido pDMW263	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 31	Descripción de componentes de fragmentos y genes quiméricos
4992-4296	Secuencia ARS18 (Nº A17608 de acceso al Banco de Genes)
SalI/SacII (8505-2014)	FBAINm GUS XPR, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356) • GUS: gen que codifica β-glucuronidasa de E. coli (Jefferson, R.A. Nature. 14:342:837-838 (1989) • XPR: ~100 pb de la región 3' del gen Xpr de Yarrowia (Nº M17741 de acceso al Banco de Genes)
6303-8505	Gen Leu2 de Yarrowia (Nº AF260230 de acceso al Banco de Genes)

Ejemplo 8

Construcción del vector pY115 de expresión de Yarrowia lipolytica y de los vectores pBY1 y pY159 de destino Gateway®

El fragmento de ADN *NcoI*/*SalI* de pDMW263 (ID de SEC Nº: 31) (véase la construcción en el Ejemplo 7), que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, se clonó en el fragmento de ADN *NcoI*/*SalI* de pDMW237 (ID de SEC Nº: 32), previamente descrito en la publicación PCT Nº WO 2006/012325. El pDMW237 contiene un gen delta-9 elongasa sintético derivado de Isochrysis galbana y de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica

(IgD9e). De esta forma, era producido el plásmido pY115 (ID de SEC Nº: 33; FIG. 7A). En la FIG. 7A, el promotor FBAINm modificado es denominado FBA1+Intrón. El promotor FBAINm modificado es denominado en otras figuras bien como FBA1+Intrón o bien YAR FBA1 PRO+intrón; estos términos se utilizan indistintamente con FBAINm.

El plásmido pY115 (ID de SEC Nº: 33) fue digerido con *Nco*I/*Not*I, y los extremos de ADN resultantes se rellenaron utilizando Klenow. Después de llenar para formar extremos romos, los fragmentos de ADN fueron tratados con fosfatasa alcalina intestinal de ternero y se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de 6.989 pb que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica se extirpó del gel de agarosa y se purificó utilizando el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA), según el protocolo del fabricante. El fragmento de 6.989 pb purificado se ligó con el casete rfA utilizando el Sistema Gateway de transformación de vectores (Cat Nº 11823-029, Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para formar vector pBY1 de destino Gateway® de Yarrowia lipolytica (ID de SEC Nº: 34; FIG. 7B).

En la construcción de pBY1, el sitio NcoI lleno proporciona un inicio ATG para la iniciación de la traducción. Así, los genes transferidos a este vector de expresión se expresan como proteínas de fusión y deben estar en el marco correcto después de la clonación Gateway®. Además, la secuencia no traducida 5' da como resultado aminoácidos adicionales que son añadidos al N-término de la proteína resultante. Por esta razón, se elaboró un segundo vector de destino Gateway® que había eliminado el codón ATG de iniciación derivado del vector, permitiendo de ese modo el inicio de la traducción a partir del gen insertado.

El promotor FBAINm se amplificó a partir del plásmido pY115 (ID de SEC Nº: 33), utilizando PCR con Cebadores de oligonucleótidos oYFBA1 (ID de SEC Nº: 35) y oYFBA1-6 (ID de SEC Nº: 36). El cebador oYFBAI (ID de SEC Nº: 35) se diseñó para introducir un sitio de *Bgl*II en el extremo 5' del promotor, y el cebador oYFBA1-6 (ID de SEC Nº: 36) se diseñó para introducir un sitio *Not*I en el extremo 3' del promotor mientras que retira el sitio NcoI, y por ello el codón de iniciación ATG. El fragmento resultante de la PCR fue digerido con *Bgl*II y *Not*I y se clonó en el fragmento *Bgl*II/*Not*I de pY115, que contiene la cadena principal del vector, para formar pY158 (ID de SEC Nº: 37).

El plásmido pY158 (ID de SEC Nº: 37) fue digerido con *Not*I, y los extremos de ADN resultantes se rellenaron. Después de rellenar para formar extremos romos, los fragmentos de ADN se trataron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero y se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de 6.992 pb que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica se extirpó del gel de agarosa y se purificó utilizando el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA), según el protocolo del fabricante. El fragmento de 6.992 pb purificado se ligó con el casete rfA utilizando Sistema Gateway de transformación de vectores(Cat Nº 11823-029, Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para formar vector pY159 de destino Gateway® de Yarrowia lipolytica (ID de SEC Nº: 38; FIG. 7C).

Ejemplo 9

Construcción de vectores de expresión pBY-EgC20elo1 (EgC20elo1), pY132 (EgDHAsyn1), pY161 (EgDHAsyn1) y pY164 (EgDHAsyn2) de Yarrowia lipolytica

El plásmido se purificó a partir de clones eeg1c.pk005.p14.f (Ejemplo 3), eeg1c.pk016.e6.f (Ejemplo 4), eeg1c-1 (Ejemplo 5) utilizando el Kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA), según el protocolo del fabricante. Utilizando mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase® II (Nº 11791-020 de Cat., Invitrogen Corporation) y según el protocolo del fabricante, los insertos de ADNc a partir de eeg1c.pk001.p14.f (que comprende EgC20elo1) y eeg1c.pk016.e6.f (que comprende EgDHAsyn1) se transfirieron a pBY1 (ID de SEC Nº: 34; FIG. 7B) para formar pBY-EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 39, FIG. 7D) y pY132 (ID de SEC Nº: 40; FIG. 8A), respectivamente. El inserto de ADNc a partir de eeg1c-1 (que comprende EgDHAsyn2) no se transfirió a pBY1, porque habría dado como resultado que se expresara el marco de traducción erróneo.

Utilizando mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase® II (Nº 11791-020 de Cat., Invitrogen Corporation) y según el protocolo del fabricante, los insertos de ADNc a partir de eeg1c.pk016.e6.f y eeg1c-1 se transfirieron a pY159 (ID de SEC Nº: 38; Ejemplo 8) para formar pY161 (ID de SEC Nº: 41, FIG. 8B) y pY164 (ID de SEC Nº: 42; FIG. 8C), respectivamente.

Ejemplo 10

Construcción de vectores de expresión PY141 (EgDHAsyn1*), pY143 (EgDHAsyn1* C20EloDom1) y pY149 (EgDHAsyn1* C20EloDom2Linker) de Yarrowia lipolytica

La EgDHAsyn1 se amplificó a partir del clon eeg1c.pk001.e6.f con cebadores de oligonucleótidos EgEPAEloDom-5 (ID de SEC Nº: 43) y oEUG el4-3 (ID de SEC Nº: 44), utilizando la ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Cat. Nº F553S, Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1062 (ID de SEC Nº: 45).

Un sitio NcoI interno en los nucleótidos 619-624 se eliminó de EgDHAsyn1 en pKR1062 utilizando el kit Quickchange® (Nº 200518 de Cat., Stratagene, La Jolla, CA) de mutagénesis dirigida al sitio, con oligonucleótidos

EgEloD4Mut-5 (ID de SEC Nº: 46) y EgEloD4Mut-3 (ID de SEC Nº: 47), según el protocolo del fabricante. Después de una amplia secuenciación, un clon con el sitio NcoI eliminado (es decir, una mutación ccatgg en ccttgg) y sin hacer cambios en nucleótidos adicionales fue elegido para su posterior estudio. Este clon se designó pLF115-7 (ID de SEC Nº: 48). La secuencia de nucleótidos para EgDHAsyn1 que tiene el sitio NcoI eliminado (EgDHAsyn1*) se expone en la ID de SEC Nº: 205. La correspondiente secuencia de aminoácidos es idéntica a la ID de SEC Nº: 12.

Construcción del plásmido pY141, expresando EgDHAsyn1*: El fragmento de ADN NcoI/NotI de pLF115-7 (ID de SEC Nº: 48), que contiene EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 205; sin el sitio interno NcoI; en el nt 621 de la CDS EgDHAsyn1; ccatgg a ccttgg), se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY141 (ID de SEC Nº: 49; FIG. 8D). Por ello, el plásmido pY141 contiene el gen EgDHAsyn1* de longitud completa (etiquetado como “EgDHAsyn1(-NcoI)" en la FIG), bajo control del promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356; etiquetado como "FBA1+Intron " en la FIG), y la secuencia de terminación Pex20 a partir del gen Yarrowia Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes).

Construcción del plásmido pY143 que expresando EgDHAsyn1-C20EloDom1: La secuencia de nucleótidos para el dominio elongasa C20 EgDHAsyn1* (EgDHAsyn1C20EloDom1) en pY141 se expone en la ID de SEC Nº: 206 (idéntica a la ID de SEC Nº: 201, pero el sitio NcoI eliminado). La secuencia de aminoácidos correspondiente es idéntica a la ID de SEC Nº: 202.

La EgDHAsyn1C20EloDom1 (ID de SEC Nº: 206) se amplificó a partir de pLF115-7 con cebadores de oligonucleótidos EgEPAEloDom-5 (ID de SEC Nº: 43) y EgDPAEloDom-3 (ID de SEC Nº: 50) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pHD16 (ID de SEC Nº: 51).

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pHD16 (ID de SEC Nº: 51), que contiene el EgDHAsyn1C20EloDom1 (sin el sitio interno NcoI), se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY143 (ID de SEC Nº: 52; FIG. 9A) El plásmido pY143 contiene el dominio N-término de EgDHAsyn1* (EgDHAsyn1C20EloDom1) y no incluye el enlazador rico en prolina o el dominio delta-4 desaturasa.

Construcción del plásmido pY149, expresando EgDHAsyn1-C20EloDom2Linker: El dominio elongasa C20 EgDHAsyn1* (ID de SEC Nº: 206) y el enlazador rico en prolina (ID de SEC Nº: 197), se amplificó a partir de pLF115-7 (ID de SEC Nº: 48) con cebadores de oligonucleótidos EgEPAEloDom-5 (ID de SEC Nº: 43) y oEUGsyn6-2 (ID de SEC Nº: 53) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® según el protocolo del fabricante (Nº F553S de Cat, Finnzymes Oy, Finlandia). El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1071 (ID de SEC Nº: 54).

El fragmento de ADN NcoI/Ec/132II de pKR1071 (ID de SEC Nº: 54) se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115 (donde el sitio Noti había sido rellenado), que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY149 (ID de SEC Nº: 55; FIG. 9B). El plásmido pY149 contiene el fusión génica EgDHAsyn1C20EloDom1/enlazador rico en prolina (es decir, EgDHAsyn1C20EloDom2Linker; ID de SEC Nº: 207), pero no contiene el dominio delta-4 desaturasa. La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1C20EloDom2Linker se expone en la ID de SEC Nº: 208. Además de los aminoácidos del dominio elongasa C20 EgDHAsyn1* y el enlazador rico en prolina, se añadieron 4 aminoácidos adicionales (es decir, SCRT) después de la región enlazadora como resultado de cómo se sintetizó y se clonó el fragmento.

Ejemplo 11

Construcción de vectores de expresión de Yarrowia lipolytica para la generación de nuevas proteínas de fusión elongasa C20/delta-4 desaturasa

Para sintetizar nuevas proteínas de fusión elongasa C20/delta-4 desaturasa, se añadió un único sitio SbfI al extremo 3’ del dominio elongasa C20 de EgDHAsyn1* después de la región del enlazador rico en prolina (EgDHAsyn1C20EloDom3Linker). La EgDHAsyn1C20EloDom3 se amplificó a partir de pLF115-7 (ID de SEC Nº: 48) con cebadores de oligonucleótidos EgEPAEloDom-5 (ID de SEC Nº: 43) y oEUGsyn6-3 (ID de SEC Nº: 56) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy 1 Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1091 (ID de SEC Nº: 57).

El fragmento de ADN NcoI/Ec/136II de pKR1091 (ID de SEC Nº: 57), que contiene EgDHAsyn1C20EloDom3Linker, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115 (donde el NotI se rellenó para formar un extremo romo), que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY155 (ID de SEC Nº: 58).

Con el fin de sintetizar nuevas proteínas de fusión elongasa C20/delta-4 desaturasa, se añadió un único sitio SbfI al extremo 5' de varias delta-4 desaturasas. En cada caso, el sitio SbfI está situado después del sitio de inicio ATG de cada secuencia de codificación y dio lugar a la adición y/o reemplazo de unos pocos aminoácidos en el extremo N-término de La delta-4 desaturasa codificada por los genes.

Construcción del plásmido pY156, expresando EgDHAsyn1-C20EloDom3-liD4*: La delta-4 desaturasa Isochrysis galbana (ID de SEC Nº: 209; lgD4) se amplificó a partir de pRIG6 (descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2002/090493) con oligonucleótidos oRIG6-1 (ID de SEC Nº: 59) y oRIG6-2 (ID de SEC Nº: 60) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante , que contiene la CDS lgD4 y es idéntica a la ID de SEC Nº: 209, excepto que un sitio SbfI se añadió en el extremo 5' después del codón de iniciación (lgD4*; ID de SEC Nº: 210), se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1067 (ID de SEC Nº: 61). La secuencia de aminoácidos para lgD4* a partir de pKR1067 se expone en la ID de SEC Nº: 211 y es idéntica a la de lgD4 (ID de SEC Nº: 30), excepto que los primeros 4 aminoácidos (es decir, MCNA) han sido cambiados por MALQ debido a la adición del sitio SbfI en la secuencia de nucleótidos.

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1067 (ID de SEC Nº: 61), que contiene lgD4*, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY150 (ID de SEC Nº: 62; FIG. 9C). En la FIG. 9C, lgD4* es etiquetado como "lg d4 DS". De esta forma, lgD4* podría expresarse sola en Yarrowia

El fragmento de ADN XbaI/Sbft de pKR1091 (ID de SEC Nº: 57; supra), que contiene EgDHAsyn1C20EloDom3Linker, se clonó en el fragmento de ADN XbaI/SbfI de pKR1067 (ID de SEC Nº: 61), que contiene lgD4*, para producir pKR1097 (ID de SEC Nº: 63). Por ello, se hizo una fusión en marco entre EgDHAsyn1C20EloDom3Linker y lgD4*, Separados por la región del enlazador rica en prolina (denominada EgDHAsyn1C20EloDom3-lgD4; ID de SEC Nº: 212). La secuencia de aminoácidos para EgDHAsyn1C20EloDom3-lgD4 se expone en la ID de SEC Nº: 213.

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1097 (ID de SEC Nº: 63), que contiene el EgDHAsyn1C20EloDom3-lgD4, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY156 (ID de SEC Nº: 64; FIG. 9D). En la FIG. 9D, la EgDHAsyn1C20EloDom3-lgD4 es etiquetada como "EGel-IGd4".

Construcción del plásmido pY152, expresando EgDHAsyn1-D4Dom1*: Una región del C-término de EgDHAsyn1* (ID de SEC Nº: 205) que contiene el dominio delta-4 desaturasa (EgDHAsyn1 D4Dom1; ID de SEC Nº: 214; que corresponde a la secuencia de aminoácidos EgDHAsyn1D4Dom1 se expone en la ID de SEC Nº: 215), comenzando justo después del final de la región del enlazador rico en prolina, se amplificó a partir de pLF115-7 (como se describe en el Ejemplo 10) con oligonucleótidos oEGslne6-1 (ID de SEC Nº: 65) y oEUGel4-3 (ID de SEC Nº: 44) (Nº F553S de Cat) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® según el protocolo del fabricante. El oligonucleótido oEGslne6-1 (ID de SEC Nº: 65) introdujo un codón de iniciación ATG en el extremo 5' del producto de la PCR seguido por un sitio SbfI. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1069 (ID de SEC Nº: 66). Las nuevas CDS y las secuencias de aminoácidos que contienen EgDHAsyn1D4Dom1 de pKR1069 (es decir, EgDHAsyn1D4Dom1*) se exponen en la ID de SEC Nº: 216 y en la ID de SEC Nº: 217, respectivamente. La secuencia de aminoácidos para EgDHAsyn1D4Dom1* (ID de SEC Nº: 217) es idéntica a la de EgDHAsyn1D4Dom1 (ID de SEC Nº: 215), excepto que los 2 primeros aminoácidos (es decir, SG) han sido cambiados por MAL debido a la adición del sitio SbfI en la secuencia de nucleótidos.

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1069 (ID de SEC Nº: 66), que contiene el EgDHAsyn1D4Dom1*, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm Yarrowia lipolytica, para producir pY152 (ID de SEC Nº: 67; FIG. 10A). En la FIG. 10A, el EgDHAsyn1D4Dom1* es etiquetado como "EUG d4 (prueba fus)". De esta forma, la EgDHAsyn1D4Dom1* podría expresarse sola en Yarrowia.

Construcción del plásmido pY157, expresando EgDHAsyn1-C20EloDom3-EqD4Dom1: El fragmento de ADN XbaI/SbfI de pKR1091 (ID de SEC Nº: 57), que contiene EgDHAsyn1C20EloDom3-Linker, se clonó en el fragmento de ADN XbaI/SbfI de pKR1069, que contiene el EgDHAsyn1D4Dom1*, para producir pKR1099 (ID de SEC Nº: 68) De esta forma, se hizo una fusión en marco entre la EgDHAsyn1C20EloDom y la EgDHAsyn1D4Dom1*, separadas por la región del enlazador rica en prolina (denominada EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1; ID de SEC Nº: 218). La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1 (ID de SEC Nº: 219) es casi idéntica a EgDHAsyn1 excepto en un aminoácido (es decir, G323L basado en la numeración para EgDHAsyn1) estaba cambiado debido al sitio de clonación SbfI y a la unión de la fusión.

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1099 (ID de SEC Nº: 68), que contiene el EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY157 (ID de SEC Nº: 69; FIG. 10B). En la FIG. 10B, el EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1 es etiquetado como "EGel-EGd4 fus".

Construcción del plásmido pY153, expresando EgDHAsyn1*D4Dom2: Una región del C-término de EgDHAsyn1 que contiene el dominio delta-4 desaturasa y algunos de los dominios elongasa C20 (EgDHAsyn1D4Dom2; ID de SEC Nº: 220; la secuencia de aminoácidos correspondiente para EgDHAsyn1D4Dom2 se expone en la ID de SEC Nº: 221), que corresponde a la secuencia de aminoácidos identificada como EgD4 (ID de SEC Nº: 13; Meyer et al., Biochemistry 42(32): 9779-9788 (2003)), se amplificó a partir de pLF115-7 (descrito en el Ejemplo 10) con oligonucleótidos oEUGel4-4 (ID de SEC Nº: 70) y oEUGel4-3 (ID de SEC Nº: 44) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1073 (ID de SEC Nº: 71).

El fragmento de ADN PciI/NotI de pKR1073 (ID de SEC Nº: 71), que contiene el EgDHAsyn1D4Dom2, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica, para producir pY153 (ID de SEC Nº: 72; FIG. 10C). En la FIG. 10C, la EgDHAsyn1D4Dom2 es etiquetada como EUG d4 (HZ). De esta forma, la EgDHAsynD4Dom2 podría expresarse sola en Yarrowia.

Construcción del plásmido pY160, expresando EgDHAsyn1-C20EloDom3-SaD4*: La delta-4 desaturasa de Schizochytrium aggregatum (ID de SEC Nº: 222; SaD4) se amplificó a partir de pRSA-1 (descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2002/090493) con oligonucleótidos oRSA1-1 (ID de SEC Nº: 73) y oRSA1-2 (ID de SEC Nº: 74) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante , que contiene la CDS SaD4 y es idéntico a la ID de SEC Nº: 222, excepto que estaba añadido un sitio SbfI en el extremo 5' después del codón de iniciación (SaD4*; ID de SEC Nº: 223), se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1068 (ID de SEC Nº: 75). La secuencia de amino para SaD4* de pKR1068 se expone en la ID de SEC Nº: 224 y es idéntica a la de SaD4 (ID de SEC Nº: 28), excepto que los primeros 3 aminoácidos (es decir, MTV) han sido cambiados por MALQ debido a la adición del sitio SbfI en la secuencia de nucleótidos.

El fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1068 (ID de SEC Nº: 75) (digestión parcial para evitar sitio interno NcoI), que contiene el SaD4*, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pY115, que contiene el promotor FBAINm Yarrowia lipolytica, para producir pY151 (ID de SEC Nº: 76; FIG. 10D). En la FIG. 10D, el SaD4* es etiquetado como "RSA d4 DS". De esta forma, la SaD4* podría expresarse sola en Yarrowia.

El fragmento de ADN SbfI/NotI de pKR1068 (ID de SEC Nº: 75), que contiene el SaD4*, se clonó en el fragmento de ADN SbfI/NotI de pY157 (ID de SEC Nº: 69), que contiene el EgDHAsyn1C20EloDom3Linker, para producir pY160 (ID de SEC Nº: 77; FIG. 11). De esta forma, se hizo una fusión en marco entre el EgDHAsyn1C20EloDom3 y la SaD4*,separadas por la región del enlazador rico en prolina (es decir, EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4; ID de SEC Nº: 225). La secuencia de aminoácidos para EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4 se expone en la ID de SEC Nº: 226.

Ejemplo 12

Condiciones de cultivo de Euglena anabaena, perfil de lípidos y aislamiento del ARNm

La Euglena anabaena se obtuvo en el laboratorio del Dr. Richard Triemer en la Universidad del Estado de Michigan (East Lansing, MI). Aproximadamente 2 ml de la Cultura fueron retirados para el análisis de lípidos y se centrifugaron a 1.800 g durante 5 min. El sedimento se lavó una vez con agua y se volvió a centrifugar. El sedimento resultante se secó durante 5 min bajo vacío, se volvió a suspender en 100 μl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación. Después de esto, se añadieron 0,5 ml de hexano, y los viales se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente con agitación. Se separaron ésteres metílicos de ácidos grasos (5 μl inyectados en el seno de capa de hexano) y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases de Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Nº 24152 de Cat). La temperatura del horno se programó manteniéndola a 170ºC durante 1,0 min, aumentando a 240ºC a 5ºC/min, y después manteniendo 1,0 min adicionales. El gas portador se suministró mediante un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los patrones comercialmente disponibles (Un-Chek Prep, Inc. Cat. Nº T-99-A), y el cromatograma resultante se muestra en la FIG. 12. La presencia de EPA y DHA en el perfil de ácidos grasos sugirió que Euglena anabaena sería una buena fuente de genes de biosíntesis de PUFA de cadena larga tal como, pero sin limitares a elongasas C20, delta-4 desaturasas y/o sintasas de DHA.

Los 5 ml restantes de un cultivo en fase de desarrollo activa se transfirió a 25 ml de medio AF-6 (Watanabe & Hiroki, NIES-Collection Listo f Strains, 5ª ed., National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, 127 pág. (2004)) en un matraz de vidrio de 125 ml. Los cultivos de Euglena anabaena se cultivaron a 22ºC con un ciclo de 16 horas de luz, 8 h de oscuridad durante 2 semanas con agitación muy suave.

Después de 2 semanas, el cultivo (25 ml) se transfirió a 100 ml de medio AF-6 en una botella de vidrio de 500 ml, y el cultivo se desarrolló durante 1 mes como se describió anteriormente. Después de este tiempo, dos alícuotas de 50 ml se transfirieron a dos botellas de vidrio de 500 ml separadas que contenían 250 ml de medio AF-6, y los cultivos se hicieron crecer durante dos meses como se describió anteriormente (dando un total de la ~ 600 ml de cultivo).

Después de esto, los cultivos se sedimentaron por centrifugación a 1.800 g durante 10 Minutos, se lavaron una vez con agua, y se volvieron a centrifugar. El ARN total se extrajo de uno de los sedimentos resultantes utilizando el reactivo ARN STAT-60® (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX) y según el protocolo del fabricante (úsense 5 ml de reactivo, ARN disuelto en 0,5 ml de agua). De esta forma, 340 μg de ARN total (680 μg/ml) se obtuvieron a partir del sedimento. El sedimento restante se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80ºC. El ARNm se aisló del total de 340 μg de ARN utilizando el kit de purificación de ARNm (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), según el protocolo del fabricante. De esta forma, se obtuvieron 9,0 g de ARNm.

Ejemplo 13

Síntesis de ADNc de Euglena anabaena, biblioteca de construcción e identificación de sintasas de DHA a partir de eug1c de la biblioteca de ADNc

Una biblioteca de ADNc se generó utilizando el kit de construcción de una biblioteca de ADNc Cloneminer (Nº 18249-029 de Cat., Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), según el protocolo del fabricante (Versión B, 25-0608). utilizando el procedimiento sin radiomarcaje, se sintetizó ADNc a partir de 5,12 μg de ARNm (Ejemplo 12) utilizando el cebador Biotin-attB2-Oligo(dT). Después de la síntesis de la primera y segunda cadena, se añadió el adaptador attB1; se realizó la ligadura; y el ADNc se fraccionó por tamaño utilizando cromatografía de columna. ADN de las fracciones se concentró, se recombinó en pDONR®222 y se transformó en células resistentes al fago ElectroMAX® DH10B® T1 de E. coli (Invitrogen Corporation). La biblioteca de Euglena anabaena se denominó eug1c.

Aproximadamente 17.000 clones de biblioteca eug1c de ADNc se sembraron en 3 grandes placas Petri cuadradas (24 cm x 24 cm) (Corning, Corning, NY), conteniendo cada una medios LB+50 μg/ml de agar kanamicina. Las células se cultivaron, se transfirieron a membrana Biodyne B, y se hibridaron con un fragmento de ADN NcoI/NotI, que contiene EgDHAsyn1*, de pY141, exactamente como se describe en el Ejemplo 5. De esta forma, se identificaron 11 clones positivos (designados como eug1c-1 a eug1c-11).

Los clones Positivos se cultivaron, y el ADN se purificó y se secuenció como se describe en el Ejemplo 2 utilizando el cebador Universal M13F para el cebado del vector (ID de SEC Nº: 1), cebador M13-28Rev para el cebado del vector (ID de SEC Nº: 14), y los oligonucleótidos WobbleT cebados en la cola poli (A). Basado en los datos de secuencias iniciales, la secuencia del fragmento interno adicional se obtuvo de una forma similar utilizando los oligonucleótidos EaDHAsyn5' (ID de SEC Nº: 78), EaDHAsyn5'2 (ID de SEC Nº: 79), EaDHAsyn5'3 (ID de SEC Nº: 80) y EaDHAsyn5'4 (ID de SEC Nº: 81), EaDHAsyn3' (ID de SEC Nº: 82), EaDHAsyn3'2 (ID de SEC Nº: 83), EaDHAsyn3'3 (ID de SEC Nº: 84), EaDHAsyn3'4 (ID de SEC Nº: 85) y EaDHAsyn3'5 (ID de SEC Nº: 86). De esta forma, se obtuvieron las secuencias completas de los insertos de los clones eug1c.

Las secuencias fueron alineadas y comparadas utilizando un Sequencher® (Versión 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), y de esta forma, los clones podrían ser categorizados en uno de cuatro grupos distintos basado en la secuencia de inserto (identificados como EaDHAsyn1 a EaDHAsyn4). Los clones representativos que contienen el ADNc para cada clase de secuencia se eligieron para estudios posteriores, y las secuencias para cada plásmido representativo (es decir, pLF117-1, pLF117-2, pLF117-3 y pLF117-4) se muestran como ID de SEC Nº: 87, ID de SEC Nº: 88, ID de SEC Nº: 89 e ID de SEC Nº: 90, respectivamente. La secuencia de pLF117-1 mostrada por una serie de NNNN representan una región de la cola PoliA que no estaba secuenciada. Las secuencias de codificación para EaDHAsyn1 , EaDHAsyn2, EaDHAsyn3, y EaDHAsyn4 se muestran como ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, y ID de SEC Nº: 94, respectivamente Las secuencias de aminoácidos correspondientes para EaDHAsyn1, EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4 se muestran como ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96, ID de SEC Nº: 97 e ID de SEC Nº: 98, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos para EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98) fueron evaluados por BLASTP como se describe en el Ejemplo 3 y, como era el caso para EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22), también se encontraron las cuatro secuencias EaDHAsyn que eran similares tanto a C20-PUFA Elo como a delta-4 desaturasas de ácidos grasos. Los N-términos de EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98), produjeron cada uno un valor de pLog de 58,5 (Valor E de 3e-59; 114/247 aminoácidos idénticos; identidad de 46%) frente a la Pavlova sp. CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2). Los C-término de EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98) produjeron valores de E de 0,0 (378/538 aminoácidos idénticos; identidad del 70%), 0,0 (378/538 aminoácidos idénticos; 70% de identidad), 0,0 (379/538 aminoácidos idénticos; 70% de identidad), y 0,0 (368/522 aminoácidos idénticos; 70% de identidad), respectivamente, en comparación con la secuencia de aminoácidos de delta-4 desaturasa de ácido graso de Euglena gracilis (ID de SEC Nº:13). Los resultados y probabilidades BLAST indican que los fragmentos de ácido nucleico presentes codifican todo el Euglena anabaena C20-PUFA Elo/delta-4 desaturasas de ácidos grasos.

Las secuencias de aminoácidos para EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98) se compararon utilizando el procedimiento Clustal W como se describe en el Ejemplo 6, y el alineamiento se muestra en las FIG. 13A, 13B y 13C. Curiosamente, debido a una sola eliminación de pb en la secuencia de nucleótidos, el C-término de la secuencia de aminoácidos resultante para

EaDHAsyn4 (aproximadamente los últimos 35 aminoácidos) es muy divergente y más pequeña que las otras tres proteínas EaDHAsyn.

Cuando se comparan con la secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) utilizando BLASTP, las secuencias de aminoácidos de EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 95), EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 96), EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº: 97) y EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº: 98) eran 70% (558/791), 70% (558/791), 70% (559/791) y 70% (548/775) idénticas, respectivamente.

Como era el caso para EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22), las cuatro secuencias EaDHAsyn tienen una región de enlazador rico en prolina (desde aproximadamente P300 a T332 basado en la numeración para EaDHAsyn1). El enlazador parece ser ligeramente más largo que el de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) o EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22). Las cuatro secuencias EaDHAsyn también carecen del motivo de repetición NG encontrado secuencia arriba del motivo rico en prolina de EgDHAsyn1 y EgDHAsyn2; pero, esta región, como era el caso de EgDHAsyn1 y EgDHAsyn2, es también ligeramente rica en prolina en todas las cuatro secuencias EaDHAsyn y puede desempeñar un papel en la función de enlazador.

Las secuencias de nucleótidos para los dominios de elongasa C20 de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4 se exponen en la ID de SEC Nº: 227, ID de SEC Nº: 228, ID de SEC Nº: 229 e ID de SEC Nº: 230, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para los dominios de elongasa C20 de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn3 se exponen en la ID de SEC Nº: 231, ID de SEC Nº: 232 e ID de SEC Nº: 233, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio elongasa C20 de EaDHAsyn4 es idéntica a la de EaDHAsyn1.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para el enlazador rico en prolina de EaDHAsyn1 se exponen en la ID de SEC Nº: 234 y en la ID de SEC Nº: 235, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para los enlazadores ricos en prolina de EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4 son idénticas a la de EaDHAsyn1.

Las secuencias de nucleótidos para el dominio 1 de delta-4 desaturasa de cada uno de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn4 se exponen en la ID de SEC Nº: 236, ID de SEC Nº: 237 e ID de SEC Nº: 238, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para los dominios delta-4 desaturasa de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2 y EaDHAsyn4 se exponen en la ID de SEC Nº: 239, ID de SEC Nº: 240 e ID de SEC Nº: 241, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos del dominio 1 de delta-4 desaturasa de EaDHAsyn3 es idéntica a la de EaDHAsyn1.

Las secuencias de nucleótidos para el dominio 2 de la delta-4 desaturasa de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4, incluyendo el enlazador rico en prolina y una porción del extremo 3' del dominio elongasa C20, se exponen en la ID de SEC Nº: 242, ID de SEC Nº: 243, ID de SEC Nº: 244 e ID de SEC Nº: 245, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para los dominios delta-4 desaturasa de EaDHAsyn1, EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4 se exponen en la ID de SEC Nº: 246, ID de SEC Nº: 247, ID de SEC Nº: 248 e ID de SEC Nº: 249, respectivamente.

La FIG. 29 compendia las secuencias del dominio sintasa de DHA Euglena anabaena.

Ejemplo 14

Construcción de los vectores de expresión pY165. PY166, pY167 y pY168 de Yarrowia lipolytica

Utilizando la mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase® II (Nº 11791-020 de Cat., Invitrogen Corporation) y según el protocolo del fabricante, los insertos de ADNc de pLF117-1 (ID de SEC Nº: 87), pLF117-2 (ID de SEC Nº: 88), pLF117-3 (ID de SEC Nº: 89) y pLF117-4 (ID de SEC Nº: 90) se transfirieron a pY159 (ID de SEC Nº: 38; Ejemplo 8) para formar pY165 (ID de SEC Nº: 99, FIG. 14A), pY166 (ID de SEC Nº: 100; FIG. 14B), pY167 (ID de SEC Nº: 101; FIG. 14C) y pY168 (ID de SEC Nº: 102; FIG. 14D), respectivamente. Por ello, cada plásmido contiene el gen EaDHAsyn en toda su longitud, bajo el control del promotor FBAINm de la Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356; etiquetado como "Yar FBA1 Pro+Intron" en la FIG), y la secuencia de terminación Pex20 del gen Yarrowia Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes).

Ejemplo 15

Construcción del vector de expresión pKR1061 de soja para la co-expresión de la Euglena gracilis DHA sintasa 1 (EgDHAsyn1) con la Saprolepnia diclina delta-17 desaturasa (SdD17)

El presente Ejemplo describir la construcción de un vector de soja para la co-expresión de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) con SdD17 y un etiquetador seleccionable de higromicina fosfotransferasa (hpt).

La EgDHAsyn1 se amplificó a partir pKR1049 (clon eeg1c.pk016.e6.f) con cebadores de oligonucleótidos oEGel2-1 (ID de SEC Nº: 103) y oEUG el4-3 (ID de SEC Nº: 44), utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1055 (ID de SEC Nº: 104).

Un plásmido pKR72 de partida (Nº PTA-6019 de acceso ATCC, ID de SEC Nº: 105, 7.085 pb de secuencia), derivado de un pKS123 que fue descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2002/008269, contiene el gen higromicina B fosfotransferasa (HPT) (Gritz, L. y Davies, J., Gene 25: 179-188 (1983)), flanqueado por el promotor T7 y el terminador de la transcripción (casete T7prom/HPT/T7term) y un origen bacteriano de replicación (ori) para selección y replicación en bacterias (por ejemplo, E. coli). Además, el pKR72 contiene también HPT, flanqueado por el promotor 35S (Odell et al., Nature 313: 810-812 (1985)) y terminador de la transcripción NOS 3' (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1: 561-570 (1982)) (casete 35S/HPT/NOS3'), para selección en vegetales tales como soja. El pKR72 también contiene un sitio de restricción NotI, flanqueado por el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina (Beachy et al., EMBO J. 4: 3047-3053 (1985)) y la región 3' de terminación de la transcripción del gen faseolina (Doyle et al., J. Biol. Chem. 261: 9228-9238 (1986)), permitiendo así una fuerte expresión específica de tejido en las semillas de soja de los genes clonados en el sitio NotI.

El casete βcon/NotI/Phas3' en el plásmido pKR72 (ID de SEC Nº: 105, que tiene Nº PTA-6019 ATCC) se amplificó utilizando cebadores de oligonucleótidos oCon-1 (ID de SEC Nº: 106) y oCon-2 (ID de SEC Nº: 107) utilizando la ADN polimerasa VentR® (Nº M0254S de Catálogo, New England Biolabs Inc., Beverly, MA) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante fue digerido con XbaI y se clonó en el sitio XbaI de pUC19, para producir pKR179 (ID de SEC Nº: 108).

La EgDHAsyn1 se liberó de pKR1055 (ID de SEC Nº: 104) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR179 (ID de SEC Nº: 108) para producir pKR1057 (ID de SEC Nº: 109).

El fragmento SbfI de pKR1057 (ID de SEC Nº: 109), que contiene el casete βcon/EgDHAsyn1/Phas3' se clonó en el sitio SbfI de pKR328 (ID de SEC Nº: 110; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467), que contenían SdD17, para producir vector pKR1061 (ID de SEC Nº: 111). Una representación esquemática de pKR1061 se muestra en la FIG. 15A.

Ejemplo 16

Construcción de vector de expresión pKR973 de soja para la co-expresión de la Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (PavD8) con la Euglena gracilis delta-9 elongasa (EgD9elo) y la Mortierella alpina delta-5 desaturasa (MaD5)

Euglena gracilis delta-9 elongasa (EgD9elo):

Un clon de la biblioteca de ADNc Euglena (eeg1c), denominado eeg1c.pk001.n5f, que contiene Euglena gracilis delta-9 elongasa (EgD9elo; ID de SEC Nº: 112; que se describe en la publicación de EE.UU. Nº US 2007/0118929 (presentada el 16 de noviembre de 2006, que se publicó el 24 de mayo de 2007; Expediente Fiscal Nº BB-1562) se utilizó como molde para amplificar EgD9elo con cebadores oligonucleótidos con oEugEL1-1 (ID de SEC Nº: 113) y oEugEL1-2 (ID de SEC Nº: 114) utilizando la ADN polimerasa VentR® (Nº M0254S de Cat., New England Biolabs Inc., Beverly, MA) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR906 (ID de SEC Nº: 115).

El plásmido pKR906 fue digerido con NotI, y el fragmento que contiene Euglena gracilis delta-9 elongasa se clonó en plásmido pKR132 (ID de SEC Nº: 116; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) para producir pKR953 (ID de SEC Nº: 117).

Mortierella alpina delta-5 desaturasa (MaD5):

El vector pKR287 (ID de SEC Nº: 118; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467, publicado el 26 de agosto de 2004) contiene la Mortierella alpina delta-5 desaturasa (MaD5; ID de SEC Nº: 119, que se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.075.183 y en la publicación PCT Nº WO 2004/071467 y en WO 2005/047479), flanqueado por el promotor GY1 glicina de soja y la región de terminación 3' de la leguminA2 del guisante (casete Gy1/MaD5/legA2). El vector pKR287 fue digerido con SbfI/BsiWI, y el fragmento que contiene el casete Gy1/MaD5/legA2 se clonó en el fragmento SbfI/BsiWIde pKR277 (ID de SEC Nº: 120; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) para producir pK952 (ID de SEC Nº: 121).

El vector pKR457 (ID de SEC Nº: 122), que era descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2005/047479 un contiene un sitio NotI flanqueado por el promotor del Inhibidor de Tripsina de soja Kunitz (KTI) (Jofuku et al., Plant Cell 1: 1079-1093 (1989)) y la región de terminación 3' de la KTi, cuyo aislamiento se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.372.965, seguido por el terminador de la transcripción de albúmina de soja, que era previamente descrito en la publicación PCT Nº WO 2004/071467 (casete Kti/NotI/Kti3'Salb3'). A través de una serie de etapas de sub-clonación, las secuencias que contienen sitios de restricción Asp718 se añadieron a los extremos 5' y 3' del casete de la Kti/NotI/Kti3'Salb3' para producir la ID de SEC Nº: 123.

Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (PavD8):

Pavlova lutheri (CCMP459) se obtuvo del Cultivo de Fitoplancton Marino (CCMP, West Boothbay Harbor, ME) y se desarrolló en frascos de 250 ml que contenían 50 ml de medio F/2-Si (elaborado utilizando F/2 Family Medium Kit-

KIT20F2 y Seqwater-SEA2 filtrado de CCMP) a 26ºC con agitación a 150 rpm. Los cultivos se transfieren a nuevo medio cada semana utilizando una dilución 1:4 (viejo cultivo:nuevo medio).

Los cultivos de 28 matraces (1.400 ml) se combinaron, y las células se sedimentaron por centrifugación a 1.800 x g durante 10 min, se lavó una vez con agua, y se volvieron a centrifugar. El ARN total se extrajo a partir del sedimento resultante utilizando el reactivo STAT-60® de ARN (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX), según el protocolo del fabricante. De esta forma, del sedimento se obtuvieron 2,6 mg de ARN total (2,6 mg/ml). El ARNm se aisló a partir de 1,25 mg del ARN total utilizando el kit de purificación de ARNm (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), según el protocolo del fabricante. De esta forma, se obtuvieron 112 μg de ARNm.

ADNc fue sintetizado a partir de 224 ng de ARNm utilizando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra Superscript® para el kit de RT-PCR (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA) con el cebador oligo(dT) proporcionado, según el protocolo del fabricante. Después del tratamiento con RNasa H según el protocolo, la Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (PavD8; ID de SEC Nº: 124; que se describe en la publicación de patente de EE.UU. Número US 2008/0118623 (presentada el 20 de abril de 2007; Expediente Fiscal Nº BB-1566) se amplificó a partir del ADNc resultante con cebadores oligonucleótidos PvDES5'Not-1 (ID de SEC Nº: 125) y PvDES3'Not-1 (ID de SEC Nº: 126). utilizando las condiciones descritas más adelante

ADNc (2 μl) de la reacción descrita anteriormente se combinó con 50 pmol de PvDES5'Not-1 (ID de SEC Nº: 125), 50 pmol de PvDES3'Not-1 (ID de SEC Nº: 126), 1 μl de mezcla de nucleótidos PCR (10 mM, Promega, Madison, WI), 5 μl de tampón de 10X PCR (Invitrogen Corporation), 1,5 μl de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen Corporation), 0,5 μl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation), y agua hasta 50 μl. Las Condiciones de reacción eran 94ºC durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC durante 45 s, 55ºC durante 45 s, y 72ºC durante 1 min. La PCR era terminada a 72ºC durante 7 min, y después se mantuvo a 4ºC. La reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa sobre 5 μl, y se observó una banda de ADN con un peso molecular de aproximadamente 1,3 kb. El producto restante se separó por electroforesis en gel de agarosa, y el ADN se purificó utilizando el kit de recuperación de ADN en Gel Zymoclean® (Zymo Research, Orange, CA), según el protocolo del fabricante.

El PavD8, flanqueado por sitios NotI, se clonó se clonó en el sitio NotI del casete Kti/NotI/Kti3'Salb3' (ID de SEC Nº: 123), y después el fragmento de ADN fue digerido con Asp718 y clonado en el sitio SbfI de pKR952 (ID de SEC Nº: 121) para producir pKR970 (ID de SEC Nº: 127).

El plásmido pKR953 (ID de SEC Nº: 117) fue digerido con PstI, y el fragmento que contiene la Euglena gracilis delta-9 elongasa se clonó en el sitio SbfI de pKR970 (ID de SEC Nº: 127) para producir pKR973 (ID de SEC Nº: 128, FIG. 15B).

De esta forma, la Pavlova lutheri delta-8 desaturasa podría ser co-expresada con la Mortierella alpina delta-5 desaturasa y la Euglena gracilis delta-9 elongasa detrás de promotores fuertes, específicos de la semilla.

Ejemplo 17

Construcción de vector de expresión pKR1064 de soja para la co-expresión de la Euglena gracilis DHA sintasa 1 (EgDHAsyn1) con la Saprolepnia diclina delta-17 desaturasa (SdD17)

El presente Ejemplo describe la construcción de un vector de soja para la Co-expresión de EgDHAsyn1 con SdD17 y el etiquetador seleccionable acetolactato sintasa (ALS).

El fragmento PstI, que contiene la casete Ann/Sdd17/BD30 de pKR271 (ID de SEC Nº: 129; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467), se clonó en el sitio SbfI de pKR226 (ID de SEC Nº: 130; que también se describen en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) para producir vector pKR886r (ID de SEC Nº: 131). De esta forma, la Saprolegnia diclina delta-17 desaturasa (SdD17) se clonó detrás del promotor de anexina que es fuerte y específico de la semilla.

El fragmento SbfI de la pKR1057 (ID de SEC Nº: 109), que contiene el casete βcon/EgDHAsyn1/Phas3', se clonó en el sitio SbfI de pKR886r (ID de SEC Nº: 131), que contiene SdD17, para producir vector pKR1064 (ID de SEC Nº: 132). Una representación esquemática de pKR1064 se muestra en la FIG. 15C.

Ejemplo 18

Construcción de vector de expresión pKR1133 de soja para la co-expresión de la Euglena gracilis DHA sintasa 1 (EgDHAsyn1) con la Euglena gracilis Delta-9 Elongasa (EgD9elo) y la Mortierella alpina delta-5 desaturasa (MaD5)

El promotor Gy1 glicinina fue amplificado por la PCR a partir de pZBL119 (ID de SEC Nº: 133; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) utilizando cebadores oSGly-2 (ID de SEC Nº: 134) y oSGly-3 (ID de SEC Nº: 135). El fragmento de PCR resultante se subclonó en el vector de clonación intermedio pCR-Script AMP SK(+) (Stratagene), según el protocolo del fabricante, para producir el plásmido pPSgly32 (ID de SEC Nº: 136).

El fragmento PstI/NotI del plásmido pSGIy32 (ID de SEC Nº: 136), que contiene el promotor Gy1, se clonó en el fragmento Pst I/NotI de plásmido pKR142 (ID de SEC Nº: 137; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467), que contiene la región de terminación de la transcripción 3' del leguminA2, un gen de resistencia a la ampicilina, y ori bacteriano, para producir pKR264 (ID de SEC Nº: 138). Por ello, el vector pKR264 contiene un sitio NotI flanqueado por el promotor para el gen Gy1 de la glicinina y la región de terminación de la transcripción 3' de la leguminA2 (casete Gy1/NotI/legA2).

La EgDHAsyn1 fue liberado a partir de pKR1055 (ID de SEC Nº: 104; Ejemplo 15) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR264 (ID de SEC Nº: 138), para producir pKR1128 (ID de SEC Nº: 139).

El fragmento Noti de pKS129 (ID de SEC Nº: 140; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467), que contiene el MaD5 se clonó en el sitio NotI de pKR457 (ID de SEC Nº: 122; Ejemplo 16), para producir pKR606 (ID de SEC Nº: 141).

El vector pKR606 (ID de SEC Nº: 141) fue digerido con BsiWI y después rellenando para hacer romos los extremos, el fragmento que contiene el casete GY1/MaD5/legA2 se clonó en el sitio de NgoMI rellenado de pKR277 (ID de SEC Nº: 120) para producir pKR804 (ID de SEC Nº: 142).

El fragmento BsiWIde pKR1128 (ID de SEC Nº: 139), que contiene el casete Gy1/EgDHAsyn1/ legA2, se clonó en el sitio BsiWIde pKR804 (ID de SEC Nº: 142) para producir pKR1130 (ID de SEC Nº: 143)

El plásmido pKR953 (ID de SEC Nº: 117) fue digerido con Bs/WI; los extremos se hicieron romos por rellenado; y pKR953 fue digerido después con BamHI. El fragmento Bs/WI/BamHI rellenado de pKR953, que contiene el casete Salb/EgD9Elo/Phas3', se clonó en los sitios PmeI/BamHI de pNEB193 (New England Biolabs, Ipswich, MA) para producir pKR1131 (ID de SEC Nº: 144).

El plásmido pKR1131 (ID de SEC Nº: 144) fue digerido con PstI y el fragmento que contiene el Euglena gracilis delta-9 elongasa se clonó en el sitio SbfI de pKR1130 (ID de SEC Nº: 143) para producir pKR1133 (ID de SEC Nº: 145, FIG. 15D).

De esta forma, la Euglena gracilis DHA sintasa 1 podría ser co-expresada con la Mortierella alpina delta-5 desaturasa y la Euglena gracilis delta-9 elongasa detrás de promotores fuertes, específicos de la semilla.

Ejemplo 19

Construcción de vector de expresión pKR1105 de soja para la co-expresión del dominio la Euglena gracilis DHA sintasa 1/elongasa C20 (EgDHAsyn1C20EloDom1) con el Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (SaD4)

El casete βcon/NotI/Phas fue amplificado por la PCR a partir de pKS123 (ID de SEC Nº: 146; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) utilizando los cebadores oKti5 (ID de SEC Nº: 147) y oKti6 (ID de SEC Nº: 148). El fragmento de PCR resultante fue digerido con BsiWI y se clonó en el sitio BsiWI de pKR124 (ID de SEC Nº: 149; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467), que contiene el origen bacteriano de replicación y selección, para producir plásmido pKR193 (ID de SEC Nº: 150).

La EgDHAsyn1C20Elodom1 fue liberado a partir de pHD16 (ID de SEC Nº: 51; Ejemplo 10) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI de plásmido pKR193 (ID de SEC Nº: 150) para producir pKR1103 (ID de SEC Nº: 151).

El fragmento BsiWI, que contiene el EgDHAsyn1C20Elodom1, fue liberado a partir de pKR1103 (ID de SEC Nº: 151) y se clonó en el sitio BsiWI de pKR226 (ID de SEC Nº: 130; Ejemplo 17) para producir vector pKR1104 (ID de SEC Nº: 152).

El vector pKR300 (ID de SEC Nº: 153; que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467, publicado el 26 de agosto de 2004), contiene el Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (SaD4), que se describe en la patente de EE.UU. Nº 7.045.683 y en la publicación PCT Nº WO 02/090493), flanqueado por los sitios de restricción NotI. El sitio AscI presente dentro de la SaD4 se eliminó sin afectar a la correspondiente secuencia de aminoácidos para producir una nueva secuencia (ID de SEC Nº: 154) que sigue siendo flanqueada por los sitios NotI. El fragmento NotI (ID de SEC Nº: 154) se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR457 (ID de SEC Nº: 122; Ejemplo 16) para producir pKR1102 (ID de SEC Nº: 155).

El plásmido pKR1102 (ID de SEC Nº: 155) fue digerido con PstI, y el fragmento que contiene el SaD4 se clonó en el sitio SbfI de pKR1104 (ID de SEC Nº: 152) para producir pKR1105 (ID de SEC Nº: 156; FIG. 16A). De esta forma, el dominio Euglena gracilis DHA sintasa 1 elongasa C20 podría ser co-expresada con la Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa detrás de promotores fuertes, específicos de la semilla.

Ejemplo 20

Construcción de vector de expresión pKR1134 de soja para expresión de la fusión de dominio Euglena gracilis DHA sintasa 1 Elongasa C20/Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4)

La EgDHAsyn1C20EloDom3 se amplificó a partir pKR1091 con cebadores de oligonucleótidos EgEPAEloDom-5 (ID de SEC Nº: 43) y oEUGsyn6-4 (ID de SEC Nº: 157) utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1107 (ID de SEC Nº: 158).

El plásmido pKR1107 (ID de SEC Nº: 158) fue digerido con NotI, y el fragmento que contiene el EgDHAsyn1C20EloDom3 se volvió a ligar un para formar pKR1112 (ID de SEC Nº: 159).

El fragmento de ADN XbaI/PstI de pKR1112 (ID de SEC Nº: 159), que contiene EgDHAsyn1C20EloDom3, se clonó en el fragmento de ADN XbaI/SbfI de pKR1068 (ID de SEC Nº: 75; Ejemplo 11), que contiene el SaD4, para producir pKR1115 (ID de SEC Nº: 160). De esta forma, la EgDHAsyn1C20Elodom3-SaD4 se creó de nuevo sin un sitio interno SbfI pero codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la descrita en el Ejemplo 11.

La EgDHAsyn1C20Elodom3-SaD4 fue liberado a partir de pKR1115 (ID de SEC Nº: 160) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR1104 (ID de SEC Nº: 152), que contiene un etiquetador seleccionable ALS, para producir pKR1134 (ID de SEC Nº: 161; FIG. 16B).

Ejemplo 21

Construcción de vector de expresión pKR1095 de soja para la co-expresión de la Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8) con la Saprolegnia diclina delta-17 desaturasa (SdD17)

El presente Ejemplo describe la construcción de un vector de soja para la co-expresión de TpomD8 con SdD17 y un etiquetador seleccionable higromicina fosfotransferasa (hpt).

Células CCMP1491 de Tetruetreptia pomquetensis (a partir de 1 litro de cultivo) se adquirieron en el Centro Nacional Provasoli-Guillard para el Cultivo de Fitoplancton Marino (CCMP) (Laboratorio Bigelow de Ciencias Oceánicas, West Boothbay Harbor, Maine). El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), según el protocolo del fabricante. El sedimento celular se volvió a suspender en 0,75 ml de reactivo Trizol, se mezcló con 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm, y se homogeneizaron en una mini-batidora de perlas Biospec (Bartlesville, OK) al ajuste más elevado durante 3 min. La mezcla se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 30 s a 14.000 rpm para eliminar residuos y perlas de vidrio. El sobrenadante se extrajo con 150 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. La fase acuosa superior se utilizó para el aislamiento de ARN.

Para el aislamiento de ARN, la fase acuosa se mezcló con 0,375 ml de alcohol isopropílico y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. El ARN precipitado se recogió por centrifugación a 8.000 rpm y se mantuvo a 4ºC durante 5 min. El sedimento se lavó una vez con 0,7 ml de etanol al 80% y se secó al aire. Así, se obtuvieron 95 g de ARN total de Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491.

El ARN total (0,95 μg de ARN total en 1 μl) se utilizó como molde para sintetizar ADNc de doble cadena. Se utilizó el kit de Construcción de Biblioteca de ADNc Creator® Smart® de BD Bioscience Clontech (Palo Alto, CA). El ARN total (1 μl) se mezcló con 1 μl de oligonucleótido SMART IV (ID de SEC Nº: 181), 1 μl del Cebador Adaptador del kit 3'-RACE de Invitrogen (ID de SEC Nº: 182), y 2 μl de agua. La mezcla se calentó a 75ºC durante 5 min y después se enfrió en hielo durante 5 min. A la mezcla se añadieron: 2 μl de tampón de primera hebra 5X, 1 μl de DTT 20 mM, 1 μl de mezcla de dNTP (10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y 1 μl de transcriptasa inversa PowerScript. La muestra se incubó a 42ºC durante 1 h. Los ADNc de primera hebra resultantes se utilizaron después como moldes para amplificación.

La Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8; ID de SEC Nº: 162; que se describe en la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0095915 (presentada el 22 de octubre de 2007; Expediente Fiscal Nº BB-1574) se amplificó a partir del ADNc con cebadores de oligonucleótidos TpomNot-5 (ID de SEC Nº: 163) y TpomNot-3 (ID de SEC Nº: 164) utilizando Taq polimerasa (Invitrogen Corporation) según el protocolo del fabricante.

El Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 ADNc (1 μl) se combinó con 50 pmol de TpomNot-5 (ID de SEC Nº: 163), 50 pmol de TpomNot-3 (ID de SEC Nº: 164), 1 μl de una mezcla de nucleótidos de PCR (10 mM, Promega, Madison, WI), 5 μl de tampón de PCR 10X (Invitrogen Corporation), 1,5 μl de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen Corporation), 0,5 μl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation) y agua a 50 μl. Las condiciones de reacción eran de 94ºC durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC durante 45 s, de 55ºC durante 45 s y de 72ºC durante 1 min. La PCR se terminó a 72ºC durante 7 min y después se mantuvo a 4ºC. Se analizaron 5 μl de la reacción de PCR por electroforesis en gel de agarosa, y se observó una banda de ADN con un peso molecular de aproximadamente 1,3 kb.

El producto restante se separó por electroforesis en gel de agarosa, y el ADN se purificó utilizando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean® (Zymo Research, Orange, CA), según el protocolo del fabricante. El ADN resultante se clonó en el vector pGEM®-T Easy (Promega), según el protocolo del fabricante, para producir pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165).

El TpomD8 fue liberado a partir de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI de plásmido pKR179 (ID de SEC Nº: 108; Ejemplo 15) para producir pKR1002 (ID de SEC Nº: 166).

El fragmento PstI de pKR1002 (ID de SEC Nº: 166), que contiene el casete βcon/TpomD8/Phas3' se clonó en el sitio SbfI de pKR328 (ID de SEC Nº: 110; Ejemplo 15), que contiene el SdD17, para producir el vector pKR1095 (ID de SEC Nº: 167). Una representación esquemática de pKR1095 se muestra en la FIG. 16C

Ejemplo 22

Construcción de vector de expresión pKR1132 de soja para la co-expresión de Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8) con Euglena gracilis Delta-9 Elongasa (EqD9elo) y Mortierella alpina delta-5 desaturasa (MaD5)

El TPomD8 fue liberado a partir de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165; Ejemplo 21) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR264 (ID de SEC Nº: 138; Ejemplo 18) para producir pKR1127 (ID de SEC Nº: 168).

El fragmento BsiWI de pKR1127 (ID de SEC Nº: 168), que contiene el casete Gy1/TPomD8/legA2, se clonó en el sitio BsiWI de pKR804 (ID de SEC Nº: 142; Ejemplo 18) para producir pKR1129 (ID de SEC Nº: 169).

El plásmido pKR1131 (ID de SEC Nº: 144; Ejemplo 18) fue digerido con PstI, y el que contiene el fragmento Euglena gracilis delta-9 elongasa se clonó en el sitio SbfI de pKR1129 (ID de SEC Nº: 169) para producir pKR1132 (ID de SEC Nº: 170, FIG. 16D). De esta forma, Tetruetreptia pomquetensis delta-8 desaturasa podría ser co-expresada con Mortierella alpina delta-5 desaturasa y Euglena gracilis delta-9 elongasa detrás de promotores fuertes, específicos de la semilla.

Ejemplo 23

Construcción de vector de expresión KS373 de soja para expresión de una fusión de Euglena gracilis Delta-9 Elongasa/Enlazador Euglena gracilis DHA sintasa 1/Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (EgD9elo-EgDHAsyn1Link-PavD8)

Una fusión en marco entre la Euglena gracilis delta-9 elongasa (EgD9elo; Ejemplo 16, ID de SEC Nº: 112), enlazador de Euglena gracilis DHA sintasa 1 rica en prolina (EgDHAsyn1Link; ID de SEC Nº: 171; descrita en el Ejemplo 6 y mostrada en la FIG. 6), y Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (PavD8; Ejemplo 16, ID de SEC Nº: 124) se construyó utilizando las condiciones descritas a continuación.

Se hizo una fusión inicial en marco entre EgD9elo y la EgDHAsyn1Link (EgD9elo-EgDHAsyn1Link), flanqueada por un sitio NcoI en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3', mediante amplificación por PCR. La EgD9elo (ID de SEC Nº: 112) se amplificó con los oligonucleótidos MWG507 (ID de SEC Nº: 172) y MWG509 (ID de SEC Nº: 173), utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia), según el protocolo del fabricante. La EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 171) se amplificó de forma similar con oligonucleótidos MWG510 (ID de SEC Nº: 174) y MWG511 (ID de SEC Nº: 175). Los dos productos de PCR resultantes se combinaron y se volvieron a amplificar utilizando MWG507 (ID de SEC Nº: 172) y MWG511 (ID de SEC Nº: 175) para formar EgD9elo-EgDHAsyn1Link. La secuencia de la EgD9elo-EgDHAsyn1Link se muestra en la ID de SEC Nº: 176. La EgD9elo-EgDHAsyn1Link no contiene un codón de parada en marco secuencia arriba del sitio NotI en el extremo 3', y por lo tanto, un fragmento de ADN clonado en el sitio NotI puede dar lugar a una fusión en marco con el EgD9elo-EgDHAsyn1Link.

El plásmido KS366 (ID de SEC Nº: 177) contiene sitios de restricción NcoI y NtoI únicos, flanqueado por el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina (Beachy et al., EMBO J. 4: 3047-3053 (1985)) y la región de terminación 3' de la transcripción del gen de la faseolina (Doyle et al., J. Biol. Chem. 261: 9228-9238 (1986)). Aparte de la sustitución del sitio NotI único en el pKR72 (ID de SEC Nº: 105) con un sitio de clonación múltiple NcoI/NotI único, el casete Bcon/NcoINotI/Phas3' en KS366 es idéntica a la encontrada en pKR72 (ID de SEC Nº: 105), excepto que los sitios HindIII fueron reemplazados por sitios BamHI. El Bcon/NcoINotI/Phas3' de KS366 se clonó en el sitio BamHI del vector pBluescript II SK(+) (Stratagene).

El fragmento de ADN NcoINotI, que contiene EgD9elo-EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 176), se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de KS366 (ID de SEC Nº: 177), que contiene el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina, para producir KS366-EgD9elo-EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 178).

El fragmento NotI que contiene PavD8 (generado como se describe en el Ejemplo 16) fue clonado en el fragmento NotI de KS366-EgD9elo-EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 178) para producir KS373 (ID de SEC Nº: 179; FIG. 17).

Ejemplo 24

Construcción de vectores de expresión de soja alternativos para expresión de DHA sintasas, dominios C20 elongasa, dominios delta-4 desaturasa, proteínas sintéticas de fusión C20 elongasa/delta-4 desaturasa, y otras proteínas sintéticas de fusión elongasa/desaturasa.

Además de los genes, promotores, terminadores y casetes de genes descritos en este documento, un experto en la técnica pueden comprender que pueden sintetizarse otras combinaciones de casetes promotor/gen/terminador de una forma similar, pero sin limitarse a lo que se describe en el presente documento para expresión de EgDHAsyn1. De igual forma, puede ser deseable expresar otros genes PUFA (tales como los descritos en la Tabla 23), para la co-expresión con cualquiera de las sintasas de DHA de la presente invención o dominios de la sintasa DHA (es decir, dominio elongasa C20 o dominio delta-4 desaturasa expresados de forma individual). Además, las fusiones sintéticas entre un dominio elongasa y un dominio desaturasa separados por una región de enlazadora adecuada podría hacerse y expresarse. Por ejemplo, una fusión sintética entre una elongasa C20 (o dominio elongasa C20 a partir de una sintasa DHA) y una delta-4 desaturasa adecuada (o dominio delta-4 desaturasa a partir de una sintasa DHA) podría hacerse y expresarse. Como alternativa, podrían usarse como tales otras desaturasa s o elongasas, pero sin limitarse a la fusión de síntesis descrita en el presente documento entre una delta-9 elongasa y una delta-8 desaturasa separadas por un enlazador de una sintasa de DHA (es decir, el Ejemplo 23).

Por ejemplo, las publicaciones PCT Nº WO 2004/071467 y WO 2004/071178 describen el aislamiento de una serie de secuencias de promotor y de terminación de la transcripción para su uso en la expresión en soja específica del embrión. Además, la publicación PCT Nº WO 2004/071467, WO 2005/047479 y WO 2006/012325 describen la síntesis de múltiples combinaciones de casetes promotor/gen/terminador ligando juntos promotores, genes y terminadores de la transcripción individuales en combinaciones únicas. Generalmente, un sitio NotI flanqueado por el promotor adecuado (tal como los listados en, pero sin limitarse a la Tabla 21) y un terminador de la transcripción (tal como los listados en, pero sin limitarse a la Tabla 22) se utiliza para clonar el gen deseado. Pueden añadirse sitios NotI a un gen de interés, tal como los listados en, pero sin limitarse a la Tabla 23 utilizando amplificación por PCR con los oligonucleótidos designados para introducir sitios NotI en los extremos 5' y 3' del gen. El producto de PCR resultante se digiere después con NotI y se clonó en un casete adecuado promotor/NotI/terminador adecuado.

Además, las publicaciones PCT Nº WO 2004/071467, WO 2005/047479 y WO 2006/012325 describen el enlace entre sí adicional de casetes de genes individuales en combinaciones únicas, junto con casetes de etiquetadores seleccionables adecuados, con el fin de obtener la expresión fenotípica deseada. Aunque esto se realiza principalmente utilizando diferentes sitios de enzimas de restricción, un experto en la técnica comprenderá que pueden utilizarse una serie de técnicas para lograr la combinación deseada de promotor/gen/terminador de la transcripción. Al hacerlo así, puede lograrse cualquier combinación de casetes promotor/gen/terminador de la transcripción específicos del embrión. El experto en la técnica puede comprender también que estos casetes pueden estar situados en fragmentos de ADN individuales o en múltiples fragmentos donde la co-expresión de los genes es el resultado la co-transformación de múltiples fragmentos de ADN.

Tabla 21

Promotores específicos de semillas		
Promotor	Organismo	Referencia del promotor
subunidad α' de β-conglicinina	soja	Beachy et al., EMBO J. 4:3047-3053 (1985)
Inhibidor de tripsina Kunitz	soja	Jofuku et al., Plant Cell 1:1079-1093 (1989)
Anexina	soja	WO 2004/071467
Glicinina Gy1	soja	WO 2004/071467
Albúmina 2S	soja	patente de EE.UU. Nº 6.177.613
Legumina A1	guisante	Rerie et al., Mol. Gen. Genet. 225:148-157 (1991)
β-subunidad de β-conGlicinina	soja	WO 2004/071467
BD30 (también llamada P34)	soja	WO 2004/071467
Legumina A2	guisante	Rerie et al., Mol. Gen. Genet. 225:148-157 (1991)

Tabla 22

Terminadores de transcripción		
Terminador de transcripción	Organismo	Referencia
Faseolina 3'	judía	WO 2004/071467
inhibidor 3' de tripsina Kunitz	soja	WO 2004/071467
BD30 3' (también llamada P34)	soja	WO 2004/071467
Legumina A2 3'	guisante	WO 2004/071467
Albúmina 2S 3'	soja	WO 2004/071467

Tabla 23

Genes de las vías biosintéticas de los PUFA		
Gen	Organismo	Referencias
Delta-6 desaturasa	Saprolegnia diclina	WO 2002/081668
Delta-6 desaturasa	Mortierella alpina	Patente de EE.UU. Nº. 5,968,809
Elongasa	Mortierella alpina	WO 2000/12720 Patente de EE.UU. Nº 6.403.349
Delta-5 desaturasa	Mortierella alpina	Patente de EE.UU. Nº 6.075.183
Delta-5 desaturasa	Saprolegnia diclina	WO 2002/081668
Delta-5 desaturasa	Peridinium sp.	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0271632
Delta-5 desaturasa	Euglena gracilis	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0292924
Delta-15 desaturasa	Fusarium moniliforme	WO 2005/047479
Delta-17 desaturasa	Saprolegnia diclina	WO 2002/081668
elongasa	Thraustochytrium aureum	WO 2002/08401 Patente de EE.UU. Nº 6,677,145
elongasa	Pavlova sp.	Pereira et al., Biochem. J. 384:357-366 (2004)
Delta-4 desaturasa	Schizochytrium aggregatum	WO 2002/090493 Patente de EE.UU. Nº 7.045.683
Delta-4 desaturasa	Isochrysis galbana	WO 2002/090493 Patente de EE.UU. Nº 7.045.683
Delta-4 desaturasa	Thraustochytrium aureum	WO 2002/090493 Patente de EE.UU. Nº 7.045.683
Delta-4 desaturasa	Euglena gracilis	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0218668
Delta-9 elongasa	Isochrysis galbana	WO 2002/077213
Delta-9 elongasa	Euglena gracilis	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0118929
Delta-9 elongasa	CCMP389 de Eutreptiella sp.	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2007/0117190
Delta-9 elongasa	Euglena anabaena	Pendiente
Delta-8 desaturasa	Euglena gracilis	WO 2000/34439 Patente de EE.UU. Nº 6.825.017 WO 2004/057001 WO 2006/012325
Delta-8 desaturasa	Acanthamoeba castellanii	Sayanova et al., FEBS Lett. 580: 1946-1952 (2006)
Delta-8 desaturasa	Pavlova salina	WO 2005/103253
Delta-8 desaturasa	Pavlova lutheri	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0118623
Delta-8 desaturasa	CCMP1491 de Tetruetreptia pomquetensis	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0095915
Delta-8 desaturasa	CCMP389 de Eutreptiella sp.	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0095915

Genes de las vías biosintéticas de los PUFA		
Gen	Organismo	Referencias
Delta-8 desaturasa	CCMP1594 de Eutreptiella cf8gymnastica	publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0095915
Delta-8 desaturasa	Euglena anabaena	Pendiente

Ejemplo 25

Producción y transformación del sistema modelo de cultivos somáticos de embriones de soja con los vectores de expresión de soja

Condiciones de cultivo:

Los cultivos de soja en suspensión embriogénica (cv. Jack) se mantienen en 35 ml de medio líquido SB196 (infra) en un agitador rotatorio, a 150 rpm, 26ºC con luces fluorescentes blancas frías en fotoperíodos de 16:8 horas día/noche a una intensidad de luz de 60-85 $\mu E/m^2/s$. Los cultivos son subcultivados desde 7 días a dos semanas inoculando aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de SB196 líquido recién preparado (el intervalo de subcultivo preferido es cada 7 días).

Los cultivos de suspensión embriogénica de soja son transformados con los plásmidos de expresión de soja mediante el procedimiento de bombardeo con cañón de partículas (Klein et al., Nature 327: 70 (1987)) utilizando un instrumento PDS1000 HE de biolística de DuPont (retroadaptación con helio) para todas las transformaciones.

Iniciación del cultivo de soja en suspensión embriogénica:

Los cultivos de soja se inician dos veces al mes con 5-7 días entre cada iniciación. Las vainas con semillas inmaduras de las plantas de soja disponibles son recogidas 45-55 días después de la siembra. Las semillas son retiradas de las vainas y colocadas en una caja magenta esterilizada. Las semillas de soja se esterilizan agitándolas durante 15 min en una solución de Clorox al 5% con 1 gota de jabón Ivory (es decir, 95 ml de agua destilada en autoclave más 5 ml de Clorox y 1 gota de jabón, bien mezclados). Las semillas se enjuagan utilizando 2 botellas de 1 litro de agua destilada estéril y las de menos de 4 mm se colocan en portaobjetos de microscopio individuales. El extremo pequeño de la semilla se corta y los cotiledones se presionan fuera de la cubierta de la semilla. Cuando los cultivos se están preparando para la transformación de la producción, los cotiledones se transfieren a placas que contienen medio SB1 (25-30 cotiledones por placa). Las placas son envueltas con cinta de fibra y se mantienen a 26ºC con luces fluorescentes blancas frías en fotoperíodos de 16:8 h día/noche a una intensidad de la luz de 60-80 $\mu E/m^2/s$ durante ocho semanas, con un cambio del medio después de 4 semanas. Cuando los cultivos están siendo preparados para los experimentos del sistema modelo, los cotiledones se transfirieron a placas que contenían medios SB199 (25-30 cotiledones por placa) durante 2 semanas, y después se transfirieron a SB1 durante 2-4 semanas. Las condiciones de luz y temperatura son las mismas que las descritas anteriormente. Después de la incubación en los medios SB1, los embriones secundarios se cortan y se colocan en medios líquidos SB196 durante 7 días

Preparación de ADN para el bombardeo:

Para el bombardeo se usan bien un plásmido intacto o bien un fragmento de plásmido de ADN que contiene los genes de interés y el gen etiquetador seleccionable. Los fragmentos de plásmidos de expresión de soja, cuya construcción se describe en el presente documento, se obtienen mediante el aislamiento en gel de los plásmidos digeridos. En cada caso, se utilizan 100 μg de plásmido de ADN en 0,5 ml de la mezcla específica de enzimas descrita más adelante. Los plásmidos son digeridos con AscI (100 unidades) en NEBuffer 4 (tris-acetato-20 mM, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 50 mM, ditiotreitol 1 mM, pH 7,9), 100 μg/ml de BSA, y beta-mercaptoetanol 5 mM a 37ºC durante 1,5 h. Los fragmentos de ADN resultantes se separaron por electroforesis en gel en un 1% de agarosa GTG SeaPlaque (Aplicaciones Moleculares Biowhitaker), y los fragmentos de ADN que contienen casetes del gen son cortados del gel de agarosa. El ADN se purificó a partir del gel de agarosa utilizando la enzima de digestión GELasa según el protocolo del fabricante.

Una alícuota de 50 μl de agua destilada estéril que contiene 3 mg de partículas de oro (3 mg de oro) se añade a 30 μl de una solución de ADN 10 ng/μl (bien un plásmido intacto o bien un fragmento de ADN preparado como se ha descrito en el presente documento), 25 μl de $CaCl_2$ 5 M y 20 μl de espermidina 0,1 M. La mezcla es agitada durante 3 min en el nivel 3 de un agitador vórtex y se hizo girar durante 10 s en una microcentrífuga de banco. Se retira el sobrenadante, seguido de un lavado con 400 μl 100% de etanol y otra breve centrifugación. Se eliminan los 400 μl, el etanol y el sedimento se vuelve a suspender en 40 μl de etanol al 100%. Cinco μl de la suspensión de ADN se dispensan en cada disco volador del disco del instrumento de biolística PDS1000/HE. Cada alícuota de 5 μl contiene aproximadamente 0,375 mg de oro por bombardeo (por ejemplo, por disco).

Para las transformaciones del sistema modelo, el protocolo es idéntico a excepción de algunos cambios menores (es decir, se añade 1 mg de partículas de oro a 5 μl de una solución de ADN de 1 μg/1 μl; se utilizan 50 μl de $CaCl_2$ 2,5 M, y el sedimento se vuelve a suspender finalmente en 85 μl de etanol 100% proporcionando así 0,058 mg de partículas de oro por bombardeo).

Preparación del tejido y bombardeo con ADN:

Aproximadamente 150-200 mg de cultivos de suspensión embriogénica de siete días de edad se colocan en un disco Petri vacío estéril de 60 x 15 mm, y el disco se cubre con malla de plástico. La cámara se evacua hasta un vacío de 68,58-71,12 centímetros (27-28 pulgadas) de mercurio, y el tejido es bombardeado con uno o dos disparos por placa disco con una presión de ruptura de la membrana fijado en 7,58·MPa (1.100 psi). El tejido se coloca aproximadamente 3,5 pulgadas de las pantallas de retención/detención. Las condiciones de transformación del sistema modelo son idénticas excepto que se usan 100-150 mg de tejido embriogénico; la presión de ruptura se fija en 4,48 MPa (650 psi); y el tejido se coloca aproximadamente a 6,35 cm (2,5 pulgadas) de la pantalla de retención.

Selección de embriones transformados:

Los embriones transformados se seleccionan bien utilizando higromicina (cuando se utiliza el gen higromicina B fosfotransferasa (HPT) como el etiquetador seleccionable) o bien clorosulfurón (cuando se utiliza el gen acetolactato sintasa (ALS) como el etiquetador seleccionable).

Tras el bombardeo, el tejido se coloca en los medios SB196 recién preparados y se cultivan como se ha descrito anteriormente. Seis a ocho días después del bombardeo, el SB196 se intercambia con el SB196 recién preparado que contiene bien 30 mg/l de higromicina o 100 ng/ml de clorosulfurón, dependiendo del etiquetador seleccionable utilizado. El medio de selección es renovado semanalmente. Cuatro a seis semanas después de la selección, el tejido transformado verde se observó desarrollándose a partir de agrupamientos embriogénicos necróticos no transformados.

Embrión de maduración:

Para las transformaciones de producción, se retira tejido verde aislado y se inocula en placas de múltiples pocillos para generar nuevos cultivos en suspensión embriogénica transformados, propagados por clones. Los agrupamientos embriogénicos transformados se cultivan durante cuatro-seis semanas en placas de múltiples pocillos a 26ºC en SB196 con bombillas (de 40 W) fluorescentes blancas frías (Econowatt F40/CWRS/EW blanca fría de Phillips) y Agro (Agro F40 de Phillips) en un fotoperíodo de 16:8 h con intensidad de luz de 90-120 $\mu E/m^2/s$. Después de este tiempo, los agrupamientos de embriones se retiraron a medios de agar sólidos, SB166, durante una-dos semanas y después se volvieron a cultivar en un medio SB103 durante 3-4 semanas para madurar los embriones. Después de la maduración en las placas en SB103, los embriones individuales se retiran de los agrupamientos, se secan, y se criban para las alteraciones en sus composiciones de ácidos grasos como se ha descrito supra.

Para las transformaciones de sistemas modelo, los embriones se maduran en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medios líquidos SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis 24: 393 (2005)), utilizando un procedimiento modificado. En pocas palabras, después de 4 semanas de selección en SB196, como se ha descrito anteriormente, los agrupamientos de embriones son retirados a 35 ml de SB228 (medios líquidos SHaM) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El tejido se mantiene en medios líquidos SHaM en un agitador rotatorio a 130 rpm y 26ºC, con luces fluorescentes blancas frías en fotoperíodo de 16:8 h día/noche a una intensidad de luz de 60-85 $\mu E/m^2/s$ durante 2 semanas como embriones madurados. Los embriones desarrollados durante 2 semanas en medio líquido SHaM son equivalentes en tamaño y en contenido en ácido graso a los embriones cultivados en SB166/SB103 durante 5-8 semanas.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, los embriones individuales son retirados de los agrupamientos, se secan, y se seleccionan para las alteraciones en sus composiciones de ácidos grasos como se ha descrito supra. Recetas de los medios:

SB 196 - Medio de proliferación líquido FN lite (por litro)

AEDT de Fe de MS - 100x Estándar 1	10 ml
Sulfato de MS - 100x Estándar 2	10 ml
Haluros FN Lite - 100x Estándar 3	10 ml
P, B, Mo FN Lite - 100x Estándar 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
2,4-D (10 mg/l de concentración final)	1,0 ml

KNO_3	2,83 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,463 g
Asparagina	1,0 g
Sacarosa (1%)	10 g

pH 5,8

Soluciones estándar FN Lite

Número de Estándar		1.000 ml	500 ml
1	Estándar 100x de AEDT de Fe		
	AEDT Na_2*	3,724 g	1,862 g
	$FeSO_4$ 7 H_2O	2,784 g	1,392 g
Añadir en primer lugar, disolver en botella de color oscuro mientras se agita			
2	Estándar 100x de Sulfato de MS		
	$MgSO_4$- 7 H_2O	37,0 g	18,5 g
	$MnSO_4$ - H_2O	1,69 g	0,845 g
	$ZnSO_4$ - 7 H_2O	0,86 g	0,43 g
	$CuSO_4$ - 5 H_2O	0,0025 g	0,00125 g
3	Estándar 100x de Haluros de FN Lite		
	$CaCl_2$ - 2 H_2O	30,0 g	15,0 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	$CoCl_2$ - 6 H_2O	0,0025 g	0,00125 g
4	Estándar 100x de P, B, Mo de FN Lite		
	KH_2PO_4	18,5 g	9,25 g
	H_3BO_3	0,62 g	0,31 g
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025 g	0,0125 g

Medio sólido SB1 (por litro)

1 paquete de sales de MS (Gibco/BRL - Nº 11117-066 de Cat)

1 ml vitaminas B5 1000X estándar

31,5 g de glucosa

2 ml de 2,4-D (20 mg/L de concentración final)

pH 5,7

8 g de agar TC

Medio sólido SB199 (por litro)

1 paquete de sales de MS (Gibco/BRL - Nº 11117-066 de Cat)

1 ml vitaminas B5 Estándar 1.000X

30g de sacarosa

4 ml de 2,4-D (40 mg/l de concentración final)

pH 7,0

2 g de Gelrite

Medio sólido SB 166 (por litro)

1 paquete de sales de MS (Gibco/BRL - Nº 11117-066 de Cat)

1 ml de Estándar 1.000X de vitaminas B5

60 g de maltosa

750 mg de $MgCl_2$ hexahidratado

5 g de carbón activado

pH 5,7

2 g de Gelrite

Medio sólido SB 103 (por litro)

1 paquete de sales de MS (Gibco/BRL - Nº 11117-066 de Cat)

1 ml de Estándar 1.000X de vitaminas B5

60 g de maltosa

750 mg de $MgCl_2$ hexahidratado

pH 5,7

2 g de Gelrite

Medio sólido SB 71-4 (por litro)

1 botella de sales B5 de Gamborg/sacarosa (Gibco/BRL - Nº 21153-036 de Cat)

pH 5,7

5 g de agar TC

Estándar 2,4-D

Obtener preelaborados de Phytotech Nº D 295 de Cat. - Concentración de 1 mg/ml

Estándar de vitaminas B5 (por cada 100 ml)

Almacenar alícuotas a -20ºC

10 g de mio-inositol

100 mg de ácido nicotínico

100 mg de piridoxina HCI

1 g de tiamina

Si la solución no se disuelve con la suficiente rapidez, aplicar un bajo nivel de calor a través de la placa de agitación con calefacción.

SB 228 - Histodiferenciación y maduración de soja (SHaM) (por litro)

DDI H_2O	600 ml
Macrosales 10x para SHaM FN-Lite	100 ml
Microsales 1000x de MS	1 ml
AEDT de Fe 100x de MS	10 ml
$CaCl_2$ 100x	6,82 ml
Vitaminas B5 1000x	1 ml
L-Metionina	0,149 g
Sacarosa	30 g
Sorbitol	30 g

Ajustar el volumen a 900 ml

pH 5,8

Autoclave

Añadir a medios enfriados (≤30ºC):

*Glutamina (Concentración final 30 mM) 4% 110 ml

*Nota: El volumen final será de 1.010 ml después de glutamina, adición.

Dado que la glutamina se degrada de forma relativamente rápida, puede ser preferible añadir inmediatamente antes de usar los medios. Caducidad, 2 semanas después de añadir la glutamina, los medios base se pueden mantener más tiempo sin glutamina.

Estándar #1 de Macro FN-lite para SHaM 10X - (por litro)

$(NH_4)_2SO_4$ (sulfato de amonio)	4,63 g
KNO_3 (nitrato potásico)	28,3 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (sulfato magnésico heptahidratado)	3,7 g
KH_2PO_4 (fosfato potásico, monobásico)	1,85 g

Ajustar al volumen

Autoclave

Estándar #2 1.000x de MS Micro (por 1 litro)

H_3BO_3 (ácido bórico)	6,2 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (sulfato de manganeso monohidratado)	16,9 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de cinc heptahidratado)	8,6 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (molibdato sódico dihidratado)	0,25 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (sulfato de cobre pentahidratado)	0,025 g
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (cloruro de cobalto hexahidratado)	0,025 g
KI (yoduro potásico)	0,8300 g

Llevar al volumen

Autoclave

Estándar #3 100X de AEDT de Fe (por litro)

$EDTA \cdot Na_2$ *(sal sódica del AEDT)	3,73 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de hierro heptahidratado)	2,78 g

* La sal sódica del AEDT debe estar completamente disuelta antes de añadir el hierro.

Llevar al volumen

La solución es fotosensible. La Botella (o botellas) debe envolverse en papel de aluminio para evitar la luz.

Autoclave

Estándar #4 Ca 100X (por litro)

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (cloruro de calcio dihidrato) 44 g

Llevar al volumen

Autoclave

Estándar #5 1.000x de vitamina B5 (por litro)

Tiamina HCl	10 g
Ácido nicotínico	1 g
Piridoxina HCl	1 g
Mio-inositol	100 g

Llevar volumen

Almacenar congelado

Estándar #6 - Glutamina al 4% (por litro)

DDI en agua calentada a 30ºC	900 ml
L-Glutamina	40 g

Añadir gradualmente mientras se agita y aplicar algo de calor.

No superar los 35ºC

Llevar al volumen

Esterilizar el filtro

Almacenar congelado*

* Nota: Calentar el estándar congelado en un baño a 31ºC para disolver completamente los cristales.

Ejemplo 26

Selección de clorosulfurón (ALS) y regeneración de las plantas

Selección de clorosulfurón (ALS):

Después del bombardeo, el tejido se divide entre 2 frascos con medios SB196 de nueva aportación y cultivados como se describió en el Ejemplo 25. Seis a siete días después del bombardeo, el SB196 es intercambiado con SB196 de nueva aportación que contiene agente de selección de 100 ng/ml de clorosulfurón (el estándar de clorosulfurón es de 1 mg/ml en hidróxido amónico 0,01 N). El medio de selección se renueva semanalmente. Cuatro a seis semanas después de la selección, el tejido transformado verde se puede observar a partir de los agrupamientos embriogénicos necróticos no transformados. El tejido verde aislado es retirado y se inocula en placas de múltiples pocillos que contienen SB196, y los embriones son madurados como se describió en el Ejemplo 25.

Regeneración de embriones somáticos de soja en plantas:

Con el fin de obtener plantas completas a partir de cultivos embriogénicos en suspensión, el tejido debe ser regenerado. Los embriones son madurados como se describe en el Ejemplo 25. Después de subcultivar en medio SB103 durante 3 semanas, los embriones individuales pueden ser retirados de los agrupamientos y cribados para alteraciones en sus composiciones de ácidos grasos como se describe en el presente documento. Cabe señalar que cualquier fenotipo detectable, resultante de la expresión de los genes de interés, podría ser cribado en esta etapa. Esto incluiría pero no se limitaría a las alteraciones en el perfil de ácidos grasos, perfil de proteínas y contenido, contenido de hidratos de carbono, tasa de crecimiento, viabilidad o capacidad de desarrollarse normalmente en una planta de soja.

Los embriones individuales madurados son desecados colocándolos en una pequeña placa de Petri vacía (35 x 10 mm) durante aproximadamente 4 a 7 días. Las placas son selladas con cinta de fibra (creando una pequeña cámara de humedad). Los embriones desecados son plantados en medio SB71-4 donde se dejan germinar en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Las plántulas germinadas se retiran del medio de germinación y se enjuagan a fondo con agua y después son plantadas en Redi-Earth en bandeja con un paquete de 24 celdas, cubierta con una cúpula de plástico transparente. Después de 2 semanas se retira la cúpula, y las plantas se dejan endurecer durante una semana más. Si las plantas parecen resistentes, se trasplantan a tarros de 25,4 cm (10") de Redi-Earth con hasta 3 plántulas por tarro. Después de 10 a 16 semanas, las semillas maduras se cosechan, se hacen astillas y se analizan los ácidos grasos.

Ejemplo 27

Análisis funcional de sintasas DHA de Euglena gracilis y de Euglena anabaena en Yarrowia lipolytica

Cada uno de los vectores de expresión descritos a continuación en la Tabla 24 se transformó en la cepa Y2224 de Yarrowia lipolytica (una cepa auxotrófica de uracilo ura3 de Yarrowia lipolytica) descrita en los Procedimientos Generales anteriores.

Las colonias individuales de Yarrowia lipolytica transformante que contienen un vector de expresión Yarrowia adecuado (véase la Tabla 24) se cultivaron en 3 ml de MM que carece de uracilo suplementado con 0,2% de tergitol a 30ºC durante 1 día. Después de esto, 0,05 ml se transfirieron a 3 ml del mismo medio suplementado bien sin ácido graso o bien con EPA hasta 0,175 mM. Estos se incubaron durante 16 horas a 30ºC, 250 rpm y después los sedimentos se obtuvieron por centrifugación. Las células se lavaron una vez con agua, se sedimentaron por centrifugación y se secaron al aire. Los sedimentos fueron transesterificados (Roughan, G. y Nishida, I., Arch Biochem Biophys 276 (1): 38-46 (1990)) con 500 μl de metóxido de sodio al 1% durante 30 min a 50ºC después de lo cual se añadieron 500 μl de cloruro de sodio 1 M y 100 μl de heptano. Después de mezclar a fondo y centrifugación, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se analizaron por GC como se ha descrito supra (véanse los Procedimientos Generales).

Tabla 24

Compendio de vectores transformados en Yarrowia lipolytica						
Vector	Cadena principal del Vector	Gen expresado (ID de SEC Nº:)	Ej. Nº	FIG. Nº	ID de SEC Nº:	Observaciones
pBY-EgC20elo1	pBY1	EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 5)	9	7D	39	EgC20elo1 expresado como proteína de fusión
pY132	pBY1	EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 11)	9	8A	40	EgDHAsyn1 expresado como proteína de fusión
pY161	pY159	EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 11)	9	8B	41	EgDHAsyn1 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen
pY164	pY159	EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 21)	9	8C	42	EgDHAsyn2 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen
pY141	pY115	EgDHAsyn1* (ID de SEC Nº: 205)	10	8D	49	El sitio interno NcoI de EgDHAsyn1 era eliminado para producir EgDHAsyn1*; no se hicieron cambios adicionales de nucleótidos

Compendio de vectores transformados en Yarrowia lipolytica						
Vector	Cadena principal del Vector	Gen expresado (ID de SEC Nº:)	Ej. Nº	FIG. Nº	ID de SEC Nº:	Observaciones
pY165	pY159	EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 91)	14	14A	99	EaDHAsyn1 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen
pY166	pY159	EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 92)	14	14B	100	EaDHAsyn2 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen
pY167	pY159	EaDHAsyn3 (ID de SEC Nº:93)	14	14C	101	EaDHAsyn3 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen
pY168	pY159	EaDHAsyn4 (ID de SEC Nº:94)	14	14D	102	EaDHAsyn4 expresado del sitio de inicio de la traducción del gen

El perfil de ácidos grasos de Yarrowia que expresan pBY-EgC20elo1 no mostraron elongación de EPA a DPA. El perfil de ácidos grasos, % de elongación calculado y % de desaturación calculado para los clones restantes se muestran en la FIG. 18. El porcentaje de elongación C20 (% de elong. C20) se calculó dividiendo la suma del porcentaje en peso (% en peso) para DPA y DHA entre la suma de los % en peso de EPA, DPA y DHA y multiplicando por 100 para expresarlo como un %. De igual forma, el porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. D4) se calculó dividiendo el % en peso de DHA entre la suma de los % en peso de DPA y DHA y multiplicando por 100 para expresarlo en %. Los promedios se indican mediante Promedio seguido del encabezado apropiado.

Como compendio de la FIG. 18, todas las sintasas de DHA, a excepción de EaDHAsyn4 funcionaban como elongasas C20 (alargándose de EPA a DPA) tanto como delta-4 desaturasas (desaturando DPA a DHA) en Yarrowia. La EaDHAsyn4, que contiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente diferente en el extremo C-término debido a un desplazamiento del marco en la secuencia de nucleótidos, tenía una función de elongación considerablemente menor y no se detectaba actividad desaturasa. Expresando EgDHAsyn1 en pY132 dio resulto una actividad consistentemente mayor en Yarrowia en comparación con otros constructos EgDHAsyn1, probablemente debido al hecho de que EgDHAsyn1 se expresaba como una fusión en marco entre alguna secuencia del vector, la UTR 5' de EgDHAsyn1 y la secuencia de codificación de EgDHAsyn1. La fusión resultante creada puede conducir a una actividad realzada debido a la realzada expresión en Yarrowia o debido a un aumento en la actividad para la propia enzima. Cuando solo se expresa la secuencia de codificación de EgDHAsyn1* (es decir, sin la UTR 5', véase pY141), la actividad es mayor que cuando está presente la UTR 5' pero no traducida como una fusión (es decir, véase pY161). Esta observación se debe probablemente a una disminución en la expresión de EgDHAsyn1 debido a la presencia de la 5'UTR.

Ejemplo 28

Análisis funcional de dominios de elongasa C20 y Delta-4 desaturasa independientes de EgDHAsyn1 y comparación con fusiones de heterólogos

Cada uno de los vectores de expresión descritos a continuación en la Tabla 25 (y un vector solo de control) se transformó en la cepa Yarrowia lipolytica Y2224, tal como se describe en el Ejemplo 27. EPA y/o DPA se suministraron a las células de Yarrowia transformadas. Un diagrama esquemático que muestra la estructura del dominio relativa para cada constructo en la Tabla 25 se muestra en la FIG. 21.

Tabla 25

Sumario de vectores expresado en Yarrowia lipolytica					
Vector	Gen expresado (ID de SEC Nº:)	Ej. Nº	FIG. Nº	ID de SEC Nº:	Observaciones
pY141	EgDHAsyn1* (ID de SEC Nº: 205)	10	8D	49	El sitio NcoI interno de EgDHAsyn1 era eliminado para producir EgDHAsyn1*; no se hicieron cambios adicionales de nucleótidos

Sumario de vectores expresado en Yarrowia lipolytica					
Vector	Gen expresado (ID de SEC Nº:)	Ej. Nº	FIG. Nº	ID de SEC Nº:	Observaciones
pY143	EgDHAsyn1C 20EloDom1 (ID de SEC Nº: 206)	10	9A	52	Contiene el dominio N-término de EgDHAsyn1* EgDHAsyn1C20EloDom1) y no incluye el enlazador rico en prolina o el dominio delta-4 desaturasa
pY149	EgDHAsyn1C 20EloDom2Linker (ID de SEC Nº: 207)	10	9B	55	Contiene el dominio N-término de EgDHAsyn1* así como el enlazador rico en prolina, pero no contiene el dominio delta-4 desaturasa; también contiene 4 aminoácidos adicionales (es decir, SCRT) después de la región enlazadora
pY150	IgD4* (ID de SEC Nº: 210)	11	9C	62	Delta-4 desaturasa Isochrysis galbana con el sitio SbfI en el extremo 5' después del codón de inicio
pY156	EgDHAsyn1C 20EloDom3-IgD4 ("IgFus") (ID de SEC Nº: 211)	11	9D	64	Contiene fusión en marco entre el EgDHAsyn1C20EloDom3Linker e IgD4*, separada por la región de enlazador rico en prolina
pY152	EgDHAsyn1D 4Dom1 ("EgD4Dom1") (ID de SEC Nº: 216)	11	10A	67	Contiene el dominio C-término de EgDHAsyn1* (es decir, el dominio delta-4 desaturasa, empezando justo después del extremo de la región del enlazador rico en prolina); también contiene un codón de iniciación ATG en el extremo 5' del producto de la PCR seguido por un sitio SbfI
pY157	EgDHAsyn1C 20EloDom3-EgD4Dom1 ("EgFus") (ID de SEC Nº: 218)	11	10B	69	Contiene una fusión en marco entre EgDHAsyn1C20EloDom y EgDHAsyn1 D4Dom1, separada por la región del enlazador rico en prolina (llamada EgDHAsyn C20EloDom3-EgD4Dom1); casi idéntica a EgDHAsyn1 excepto que es cambiado un aminoácido (es decir, G323L) debido al sitio SbfI de clonación y la unión de fusión
PY153	EgDHAsyn1D 4Dom2 (ID de SEC Nº: 220) "EgD4Dom2"	11	10C	72	Contiene la región del C-término de EgDHAsyn1 que contiene el dominio Delta-4 desaturasa y algo del dominio elongasa C20
pY151	SaD4* (ID de SEC Nº: 223)	11	10D	76	Delta-4 desaturasa de Schizochytrium aggregatum con el sitio SbfI en el extremo 5' después del codón de inicio
pY160	EgDHAsyn1C 20EloDom3-SaD4 ("SaFus") (ID de SEC Nº: 225)	11	11	77	Contiene la fusión en marco entre EgDHAsyn1C20EloDom3 y SaD4, separada por la región del enlazador rico en prolina

Los perfiles de los ácidos grasos de las células transformantes se analizaron posteriormente como se describe en el Ejemplo 27.

Los resultados para alimentar con EPA un vector solo de control, pY141, pY143, pY149, pY156, pY157 y pY160 se muestran en la FIG. 19. Los perfiles de ácidos grasos para Yarrowia que expresan pY150, pY151, pY152 y pY153 no mostraron elongación de EPA a DPA y no se muestran en la FIG. 19.

Los resultados para la alimentación de DPA a un vector solo de control, pY141, pY150, pY151, pY152, pY153, pY156, pY157 y pY160 se muestran en la FIG. 20. Los perfiles de ácidos grasos Yarrowia para expresar pY143 y pY149 no mostraron desaturación de DPA a DHA y no se muestran en la FIG. 20.

El porcentaje de elongación C20 (% elong C20), porcentaje delta-4 desaturación (% D4 Desat) y las medias se calcularon como se describe en el Ejemplo 27.

Como compendio de la FIG. 19 y de la FIG. 20, cuando el dominio EgDHAsyn1C20Elo se expresa solo (con o sin el enlazador; es decir, pY143 y pY149), el porcentaje medio de elongación C20 aumenta en aproximadamente 40% en comparación con el EgDHAsyn1* nativo (pY141; ID de SEC Nº: 49). Lo contrario ocurre con el dominio EgDHAsyn1 delta-4 desaturasa, donde no hay actividad con EgDHAsyn1D4Dom1 (pY152; ID de SEC Nº: 67; véase la FIG. 20) y aproximadamente el 50% menos con EgDHAsyn1D4Dom2 (pY153; ID de SEC Nº: 72; véase la FIG. 20) cuando se expresa en solitario en comparación con EgDHAsyn1* (pY141; ID de SEC Nº: 49; véase la FIG. 20) alimentado con DPA. El IgD4 no tiene actividad delta-4 desaturasa cuando se expresa solo (pY150; ID de SEC Nº: 62; véase la FIG. 20) o como una fusión (pY156; ID de SEC Nº: 64; véanse las FIG. 19 y 20) e incluso provoca una disminución de aproximadamente el 50% en la actividad de elongación cuando se fusiona con el dominio la EgDHAsyn1 elongasa C20 (pY156; ID de SEC Nº: 64; véase la FIG. 19), posiblemente debido a un plegado incorrecto. En contraste, el SaD4 expresado solo (pY151; ID de SEC Nº: 76; véase la FIG. 20) tiene aproximadamente la misma actividad delta-4 desaturasa que la del EgDHAsyn1 nativo* (pY141; ID de SEC Nº: 49; véase la FIG. 20). Curiosamente, la actividad delta-4 desaturasa de SaD4 aumenta aproximadamente 2 veces cuando se fusiona con el dominio EgDHAsyn1 elongasa C20 (pY160; ID de SEC Nº: 77; véase la FIG. 20). Cuando se fusiona un dominio EgDHAsyn1 elongasa C20 y se alimenta con EPA (pY160; ID de SEC Nº: 77; véase la FIG. 19), la actividad de delta-4 desaturasa es aproximadamente 3 veces mayor que cuando se alimenta con DPA (pY160; ID de SEC Nº: 77; véase la FIG. 20) que sugiere que el enlace de los dos dominios da como resultado una mayor eficiencia o flujo, quizás debido a la canalización del sustrato.

Ejemplo 29

Especificidad del sustrato de EgDHAsyn1*

GLA 1 STA, EDA, ERA, DGLA, ETA, ARA, EPA y DPA eran alimentados con células de Yarrowia transformadas con pY141 (EgDHAsyn1*; ID de SEC Nº: 49) y un vector solo de control y los perfiles de ácidos grasos se analizaron como se describe en el Ejemplo 27.

Los resultados para la alimentación de EPA, DPA y ARA se muestran en la FIG. 22. Los perfiles de ácidos grasos para Yarrowia alimentados con GLA, STA 1 EDA, ERA, DGLA y ETA no mostraron elongación y no se muestran en la FIG. 22. El porcentaje de elongación C20 (% elong. C20) y el porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. D4) y los promedios se calcularon como se describe en el Ejemplo 27 cuando se alimenta con EPA o DPA. Cuando se alimenta con ARA, el porcentaje de elongación C20 (% elong. C20) se calculó dividiendo la suma del % en peso para el ácido docosatetraenoico [DTA; 22:4 (7, 10, 13, 16)] y ácido omega-6 docosapentaenoico [DPAn-6; 22:5 (4, 7, 10, 13, 16)] entre la suma del % en peso de ARA, DTA y DPAn-6, y multiplicando por 100 para expresarlo en %. De igual forma, el porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. D4) cuando se alimentaba con ARA se calculó dividiendo el % en peso de DPAn-6 entre la suma del % en peso de DTA y DPAn-6, y multiplicando por 100 para expresarlo en %.

Como compendio de la FIG. 22, la EgDHAsyn1* elonga tanto ARA como EPA aunque tiene una ligera preferencia (aproximadamente un 40% mas activo) para EPA. El producto de elongación de ARA (es decir, DTA) también es desaturado en la posición delta-4 por EgDHAsyn1 para producir DPAn-6 y la actividad es de aproximadamente un 40% más alta para DTA que para DPA.

Ejemplo 30

Co-expresión de la Euglena gracilis DHA sintasa 1 con la Pavlova lutheri delta-8 desaturasa, la Mortierella alpina delta-5 desaturasa, la Saprolegnia diclina delta-17 desaturasa y la Euglena gracilis delta-9 elongasa en embriones de soja transformados con vectores de expresión pKR973 y PKR1064 de soja

Los embriones de soja somáticos maduros son un buen modelo para los embriones cigóticos. Aunque en el estado de embrión globular en cultivo liquido, los embriones somáticos de soja contienen muy bajas cantidades de proteínas de triacilglicerol o almacenan típicas proteínas de maduración, los embriones cigóticos de soja. En esta etapa de desarrollo, la proporción de triacilglicéridos totales frente a lípidos polares totales (fosfolípidos y glicolípidos) es de aproximadamente 1:4, como es típico de los embriones cigóticos de soja en la etapa de desarrollo de la que se inició el cultivo de embriones somáticos. En la etapa globular también, están esencialmente ausentes los ARNm de las proteínas prominentes de la semilla, la subunidad α' de β-conglicinina, el inhibidor 3 de tripsina de Kunitz, y la lectina de la semilla. Tras la transferencia de los medios exentos de hormonas para permitir la diferenciación con el estado de maduración de embriones somáticos, el triacilglicerol llega a ser la clase de lípidos más abundante. También, los ARNm de la subunidad α' de β-conglicinina, el inhibidor 3 de tripsina de Kunitz y la lectina de la semilla se vuelven muy abundantes mensajes en la población total de ARNm. Sobre esta base, el sistema de embriones de soja somático se comporta de forma muy parecida a embriones de soja de cigóticos en la

maduración in vivo, y es por eso un bueno y rápido sistema modelo para analizar los efectos fenotípicos de modificar la expresión de genes en la vía de biosíntesis de los ácidos grasos (véase la publicación PCT Nº WO 2002/00904, Ejemplo 3). Más importante, el sistema modelo también es predictivo de la composición de los ácidos grasos de las semillas de las plantas derivadas de embriones transgénicos.

Análisis de ácidos grasos de embriones transgénicos de soja somáticos que expresan pKR973 y pKR1064:

Los cultivos de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformaron con los fragmentos AscI de pKR973 y pKR1064 (fragmentos que contienen los casetes de expresión), como se describe para la producción en el Ejemplo 25 y como se reanudará en la Tabla 26.

Tabla 26

Sumario de vectores expresado en soja				
Vector	Ej. Nº	FIG. Nº	ID de SEC Nº:	Genes expresados
pKR973	16	15B	128	Pavlova lutheri delta-8 desaturasa, Mortierella alpina delta-5 desaturasa y Euglena gracilis delta-9 elongasa
pKR1064	17	15C	132	Euglena gracilis DHA sintasa 1 y Saprolegnia diclina delta-17 desaturasa

Un subconjunto de embriones de soja generados a partir de cada evento (diez embriones por caso) se recolectaron y se recogieron en viales de vidrio para CG y los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por transesterificación. Para la transesterificación, se añadieron 50 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) y 0,5 ml de hexano a los embriones en los viales de vidrio y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente mientras se agitaba. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados de la capa de hexano) se separaron y cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Nº 24152 de Cat., Supelco Inc). La temperatura del horno se programó para mantenerla a 220ºC durante 2,6 min, aumentando hasta 240ºC a 20ºC/min y después manteniendo durante unos 2,4 min más. El gas portador se suministró mediante un generador de Hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de patrones disponibles comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc). Los casos con un buen fenotipo se volvieron a analizar mediante CG utilizando condiciones idénticas excepto la temperatura del horno mantenida a 150ºC durante 1 min y después se incrementó hasta 240ºC a 5ºC.

Los perfiles de ácidos grasos de embriones individuales a partir de un caso representativo se muestran en la FIG. 23. Los ácidos grasos son identificados 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), 18:2 (LA), GLA, 18:3 (ALA), EDA, DGLA, ARA, ERA, JUN, EPA, 22:3 (10, 13, 16) (ácido docosatrienoico), DTA, DPA y DHA; y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 23 se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

La actividad de EgDHAsyn1 se expresa como porcentaje de elongación C20 (% de elong. C20) y/o porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. D4), calculado según la fórmula siguiente: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100.

Más específicamente, el porcentaje de elongación de EPA se muestra como % de elong. C20, determinado como: ([DPA+DHA]/[EPA+DPA+DHA])*100. El porcentaje de desaturación delta-4 para DPA se muestra como % de desat. D4, determinado como: ([DHA]/[DPA+DHA]) * 100. Otros ácidos grasos que pueden ser elongados o desaturados no estaban incluidos en este cálculo.

Además de los productos de elongación y desaturación para la EPA y ARA, parece que en la soja, DGLA es también elongado por el EgDHAsyn1 en tanto que se hizo una cantidad significativa del ácido graso 22:3 (10, 13, 16). El ácido graso fue identificado como 22:3 (10, 13, 16), ya que se encontró que tenía una masa de 22:3 por CG-EM de y tenía un perfil de EM que concordaba con el de 22:3 (10, 13, 16).

Ejemplo 31

Expresión de la fusión Euglena gracilis delta-9 elongasa/Pavlova lutheri delta-8 desaturasa (EgD9elo-EgDHAsyn1Link-PavD8) en los embriones de soja transformados con vectores de expresión de soja KS373

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con KS373 (ID de SEC Nº: 179; FIG. 17) y KS120 (que se describe en la publicación PCT Nº WO 2004/071467) como se describe para el sistema modelo en el Ejemplo 25. KS120 contiene la selección de higromicina. KS373, producido en el Ejemplo 23, permitía la expresión de una proteína de fusión que comprende la Euglena gracilis delta-9 elongasa y la Pavlova lutheri delta-8 desaturasa, en donde los dos dominios estaban vinculados con Euglena gracilis DHA sintasa 1 Linker (es decir, EgDHAsyn1Link).

Los perfiles de ácidos grasos de los cinco embriones individuales de 31 eventos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 30. Los resultados de los cinco mejores casos de elongación se muestran en la FIG. 24. Los ácidos grasos son identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), 18:2 (LA), GLA, 18:3 (ALA), EDA, DGLA, ERA y ETA; y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 24 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

La actividad de EgD9elo-EgDHAsyn1 Link-PavD8 se expresa como porcentaje de elongación delta-9 (% de elong. D9) y/o el porcentaje de desaturación delta-8 (% de desat. D8), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100.

Más específicamente, el porcentaje de elongación delta-9 se muestra como % de elong. D9, determinado como: ([EDA+ERA+DGLA+ETA]/[LA+ALA+EDA+ERA+DGLA+ETA]) * 100. El Porcentaje de desaturación delta-8 se muestra como % de desat. D8, determinado como ([DGLA+ETA]/[EDA+ERA+DGLA+ETA]) * 100.

El mejor caso de % de elong D9 tenía una elongación promedio de 22,1%, con un % promedio de desat. D8 del 92,7%. La elongación es ligeramente inferior a la observada cuando la delta-9 elongasa se expresa en solitario en los embriones de soja, aunque esto puede deberse a los pequeños número de casos examinados. En contraste, la desaturación es considerablemente mayor cuando la PavD8 se fusiona con el EgD9elo y EgDHAsyn1Link que cuando la PavD8 se expresa en solitario en embriones de soja, alcanzando casi el 100% de transformación en algunos casos. Esta transformación mejorada por la delta-8 desaturasa podría ser debido a una eficiencia o flujo aumentados, quizás debido a la canalización del sustrato.

Ejemplo 32

Síntesis y análisis funcional de un gen de elongasa C20 de codón optimizado (EgC20ES), a partir Euglena gracilis en Yarrowia lipolytica

El uso de codón del dominio elongasa C20 de EgDHAsyn1 (EgDHAsyn1C20EloDom1) de Euglena gracilis (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-303 de la ID de SEC Nº: 12) se optimizó para expresión en Yarrowia lipolytica, de una forma similar a la descrita en la publicación PCT Nº WO 2004/101753 y en la patente de EE.UU. 7.125.672. Específicamente, un gen de elongasa C20 de codón optimizado (designado "EgC20ES" y que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la ID de SEC Nº: 183 y la secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 184) se diseñó, se basó en la secuencia de codificación del dominio elongasa C20 de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 201), según el modelo de uso de codón Yarrowia (publicación PCT Nº WO 2004/101753), en la secuencia de consenso en torno al codón de iniciación de la traducción "ATG", y en las reglas generales de la estabilidad del ARN (Guhaniyogi, G. y J. Brewer, Gene, 265(1-2): 11-23 (2001)). Además de la modificación del sitio de iniciación de la traducción, 163 pb de la región codificante de 909 pb fueron modificados (17,9%) y 147 codones fueron optimizados (48,5%). Ninguna de las modificaciones en el gen de codón optimizado cambió la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (es decir, ID de SEC Nº: 184 es 100% idéntica en la secuencia para los aminoácidos 1-303 de la ID de SEC Nº:12:). El gen EgC20ES diseñado (ID de SEC Nº: 183) fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ) y se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes) para generar pEgC20ES (FIG. 51 B; ID de SEC Nº: 185).

Para analizar la función del gen EgC20ES optimizado con codón, se construyó el plásmido pZuFmEgC20ES (FIG. 52A; ID de SEC Nº: 360) que comprende un gen quimérico FBAINm::EgC20ES::Pex20 pZuFmEgC20ES. El plásmido contenía los siguientes componentes:

TABLA 27

Componentes del plásmido pZuFmEgC20ES (ID de SEC Nº: 360)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 360	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
SwaI/BsiWI (6063-318)	FBAINm::EgC20ES::Pex20, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • EgC20ES: gen elongasa C20 de codón optimizado (ID de SEC Nº: 183), derivada de Euglena gracilis; • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
2269-1389	Plásmido Co1E1 origen de replicación
3199-2339	Gen resistente a la ampicilina (AmpR) para selección en E. coli

Componentes del plásmido pZuFmEgC20ES (ID de SEC Nº: 360)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 360	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
4098-5402	Secuencia de replicación autónoma de Yarrowia (ARS18; Nº A17608 de acceso al Banco de Genes)
6935-5448	Gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZuFmEgC20ES se transformó en la cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas MM. Después 2 días de cultivo a 30ºC, 10 transformantes cultivados en las placas de MM se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas MM. Una vez desarrolladas, 10 cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y agitadas a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recolectaron por centrifugación, se extrajeron los lípidos; y los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había aproximadamente 6,2% de EPA y 2,8% de DPA de los lípidos totales producidos en los diez transformantes, en donde la eficiencia de transformación de EPA a DPA en estas 10 cepas se determinó que era aproximadamente del 31% (calculada como se describe en el Ejemplo 27). Así, estos datos experimentales demostraron que la Euglena gracilis elongasa C20 sintética de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (es decir, EgC20ES, como se expone en la ID de SEC Nº: 183) transforma activamente EPA a DPA.

Ejemplo 33

Síntesis y análisis funcional de un gen elongasa C20 de codón optimizado (EaC20ES) de Euglena anabaena en Yarrowia lipolytica

El uso de codón del dominio elongasa C20 de EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 228) de Euglena anabaena (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-299 de la ID de SEC Nº: 96) era optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica, de una forma similar a la descrita en la publicación PCT Nº WO 2004/101753, la patente de EE.UU. 7.125.672 y anteriormente en el Ejemplo 32. Específicamente, se diseñó un gen de elongasa C20 de codón optimizado (designado "EaC20ES" y que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la ID de SEC Nº: 188 y la secuencia de aminoácidos expuesta en la ID de SEC Nº: 189), basada en la secuencia de codificación del dominio elongasa C20 de EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 92), según el modelo de uso del codón Yarrowia (publicación PCT Nº WO 2004/101753), la secuencia de consenso en torno al codón de iniciación de la traducción "ATG", y las reglas generales de la estabilidad del ARN (Guhaniyogi, G. y J. Brewer, Gene, 265 (1-2): 11-23 (2001)). Además de la modificación del sitio de iniciación de la traducción, 143 pb de la región codificante de 897 pb fueron modificados (15,9%) y fueron optimizados 134 codones (44,8%). Ninguna de las modificaciones en el gen de codón optimizado cambió la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (es decir, la ID de SEC Nº: 189 es 100% idéntica en la secuencia para los aminoácidos 1-299 de la ID de SEC Nº:96). El gen EaC20ES diseñado (ID de SEC Nº: 188) era sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ) y se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes) para generar pEaC20ES (ID de SEC Nº: 190).

Para analizar la función del gen EaC20ES optimizado con codón, se construyó el plásmido pZuFmEaC20ES (ID de SEC Nº: 361) que comprende un gen quimérico FBAINm::EaC20ES::Pex20. El plásmido pZuFmEaC20ES (ID de SEC Nº: 361) era de construcción idéntica a la del plásmido pZuFmEgC20ES (ID de SEC Nº: 360; FIG. 52A), con la excepción de que se utilizó EaC20ES (ID de SEC Nº: 188) en lugar de EgC20ES (ID de SEC Nº: 183).

El plásmido pZuFmEaC20ES (ID de SEC Nº: 361) se transformó en la cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas MM. Después de 2 días de cultivo a 30ºC, 20 transformantes cultivados en las placas de MM recién preparadas se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas MM. Una vez cultivadas, 20 cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos; y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había aproximadamente 7,4% de EPA y 1% DPA de los lípidos totales producidos en los 20 transformantes, en donde la eficiencia de la transformación de EPA a DPA en estas 20 cepas se determinó que era de aproximadamente el 11% (calculado como se describe en el Ejemplo 27). Así, estos datos experimentales demostraron que la Euglena anabaena elongasa C20 sintética de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (es decir, EaC20ES, como se expone en la ID de SEC Nº: 188) transforma activamente EPA a DPA.

Ejemplo 34

Síntesis y análisis funcional de un gen delta-4 desaturasa de codón optimizado (EaD4S) de Euglena anabaena en Yarrowia lipolytica

El uso de codón del dominio delta-4 desaturasa de EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 243) de Euglena anabaena (es decir, correspondiente a los aminoácidos 259-841 de la ID de SEC Nº: 96) se ha optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica, de una forma similar a la descrita en la publicación PCT Nº WO 2004/101753, la patente de EE.UU. 7.125.672 y anteriormente en los Ejemplos 32 y 33. Específicamente, se diseñó un gen delta-4 desaturasa de codón optimizado (designado "EaD4S" y que tiene la secuencia de nucleótidos como se establece en la ID de SEC Nº: 192 y en la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 193), basada en la secuencia de codificación del dominio delta-4 desaturasa de EaDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 92), que también se proporciona como ID de SEC Nº: 194 (nucleótido) y como ID de SEC Nº: 195 (aminoácido). Además de la modificación del sitio de iniciación de la traducción, se modificaron 307 pb de la región de codificación de 1.752 pb (incluyendo el codón de parada TAA) (17,5%) y se optimizaron 285 codones (48,8%). Adicionalmente, un sitio NcoI se introdujo en torno al codón de iniciación de la traducción cambiando el segundo aminoácido del dominio delta-4 desaturasa de tipo silvestre (es decir, el resto 260 de aminoácidos de la ID de SEC Nº: 96 o el resto 2 de aminoácidos de la ID de SEC Nº: 195) a partir de un resto leucina hasta un resto valina en el gen EaD4S sintético; así, la secuencia de aminoácidos de EaD4S se expone en la ID de SEC Nº: 193. El gen EaD4S diseñado (ID de SEC Nº: 192) era sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ) y se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes) para generar pEaD4S (ID de SEC Nº: 196).

Para analizar la función del gen EaD4S de codón optimizado, se construyó el plásmido pZKL4- 220EA4 (FIG. 52B; ID de SEC Nº: 362) para integrar dos genes quiméricos de elongasa C20 y el gen quimérico de EaD4S en la lipasa 4 como locus (Nº XM_503825 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica. El plásmido pZKL4-220EA4 contenía los siguientes componentes:

Tabla 28

Componentes del plásmido pZKL4-220EA4 (ID de SEC Nº: 362)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 362	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
Asc I/BsiW I (4875-4123)	Porción 5' de 745 pb de Lipasa 4 de Yarrowia como gen (ID de SEC Nº: 363; Nº XM 503825 de acceso al Banco de Genes)
PacI/SphI (8371-7583)	Porción 3' de 782 pb de Lipasa 4 de Yarrowia como gen (ID de SEC Nº: 363; Nº XM 503825 de acceso al Banco de Genes)
Swa I/BsiW I (1980-4123)	FBAINm EaC20ES Pex20, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • EaC20ES: gen elongasa C20 de codón optimizado (ID de SEC Nº: 188; Ejemplo 33), derivada de Euglena anabaena; • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes)
Pme I/Swa I (1-1980)	YAT1 EgC20ES Lip1, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (publicación de patente Nº U.S. 2006/0094102-A1); • EgC20ES: gen elongasa C20 de codón optimizado (ID de SEC Nº: 183; Ejemplo 32), derivada de Euglena gracilis; • Lip1: Lip1 secuencia de terminación del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
Cla I/Pme I (1-10472)	EXP1 EaD4S Lip2, que comprende: • EXP1: promotor de exportación de proteína de Yarrowia lipolytica (publicación PCT Nº WO 2006/052870 y publicación de patente de EE.UU. Nº US 2006/0115881); • EaD4S: gen delta-4 desaturasa de codón optimizado (ID de SEC Nº: 192), derivada de Euglena anabaena; • Lip2: secuencia de terminación Lip2 del gen Lip2 de Yarrowia (Nº AJ012632 de acceso al Banco de Genes)

Componentes del plásmido pZKL4-220EA4 (ID de SEC Nº: 362)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 362	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
Sal I/EcoR I (10022-8403)	• Gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKL4-220EA4 fue digerido con AscI/SphI, y después se transformó en la cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas MM. Después de un cultivo de 5 días a 30ºC, 8 transformantes cultivados en las placas de MM eran recogidos y se volvían a rayar en placas MM recién preparadas. Una vez desarrolladas, estas cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos, y se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había un promedio de 0,4% de DHA y 10,2% de DPA de los lípidos totales producidos en los 8 transformantes, en donde la eficiencia de la transformación de DPA a DHA en estas 8 cepas se determinó que era aproximadamente un 4,2% (calculado como se describe en el Ejemplo 27). Así, estos datos experimentales demostraron que la Euglena anabaena delta-4 desaturasa sintética de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (es decir, EaD4S, como se expone en la ID de SEC Nº: 192) está activa, pero funciona con una eficiencia de transformación relativamente baja.

Ejemplo 35

Co-expresión del dominio Euglena gracilis DHA sintasa 1 de C20 elongasa (EgDHAsyn1C20EloDom1) con la Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (SaD4) en embriones de soja transformados con vector de expresión pKR1105 de soja.

El Ejemplo siguiente describe la generación de casos de soja transgénicos que expresan EgDHAsyn1C20EloDom1 y SaD4 que, cuando se generan en las plantas, podrían cruzarse con los casos de soja que producen EPA para generar plantas que producen DHA.

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con el fragmento AscI de pKR1105 (ID de SEC Nº: 156; FIG. 16A; fragmento que contiene el casete de expresión) y los embriones fueron madurados como se describe para la producción en el Ejemplo 25 pero con el siguiente cambio. Después de la maduración en SB103 durante 10-12 días, solo un agrupamiento de embriones para cada caso se retiro a 4 ml de medios líquidos SB148 (receta más adelante) que contienen 0,02% de tergitol y 0,33 mM de EPA en una placa de microtitulación de seis pocillos.

Medio sólido SB 103 (por litro)

1 paquete de sales de MS (Gibco/BRL-Nº 11117-066 de Cat.)

1 ml de estándar 1000X de vitaminas B5

60 g de maltosa

pH 5,7

Los agrupamientos se rompieron cuidadosamente para liberar los embriones individuales y las placas de microtitulación se agitaron en un agitador rotatorio a 150 rpm y 26ºC bajo luces fluorescentes blancas frías en un fotoperíodo de 16:8 horas día/noche a una intensidad de luz de 60-85 $\mu E/m^2/s$ durante 48 horas. Después de 48 horas, los embriones se enjuagaron con agua, se secaron y cinco embriones por caso se recogieron en viales de vidrio para CG. Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por transesterificación con TMSH y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Nº 24152 de Cat., Supelco Inc) como se describe en el Ejemplo 30. La temperatura del horno se programó para mantener a 150ºC durante 1 min y después se incrementó hasta 240ºC a 5ºC. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los estándares disponibles comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc).

De esta forma, se analizaron 122 casos transformados con pKR1105. De los 122 casos analizados, se identificó que 49 elongaban EPA (actividad elongasa C20/delta-5) y de estos, se identificó que 41 desaturaban DPA (actividad delta-4 desaturasa) para producir DHA. Los casos con las mejores actividades C20/delta-5 elongasa y delta-4 desaturasa fueron avanzados y los perfiles de ácidos grasos de la alimentación de los embriones con EPA se muestran en la FIG. 26.

Los ácidos grasos en la FIG. 26 se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (esteárico ácido), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EPA, 22:0 (ácido docosanoico), DPA, 24:0 (tetracosanoico ácido), DHA y 24:1 (ácido nervónico); y composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 26 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. La actividad de EgDHAsyn1C20EloDom1 se expresa como porcentaje de elongación de C20/delta-5 (% de elong. C20/delta-5), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto]) * 100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado de EPA se muestra como "% de elong. C20/delta-5", determinado como:([DPA+DHA]/[EPA+DPA+DHA])*100.

La actividad de la SaD4 se expresa como porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. delta-4), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto])*100. Más específicamente, el porcentaje de desaturación combinado de DPA se muestra como "% de desat. delta-4", determinado como: (DHA/[DPA+DHA]) * 100.

Ejemplo 36

Identificación de una elongasa delta-9 de Euglena anabaena UTEX 373

El presente ejemplo describe la identificación de delta-9 elongasas de una biblioteca de ADNc UTEX 373 de Euglena anabaena.

Crecimiento de Utex 373 de Euglena anabaena y preparación de ARN

El eug1c de la biblioteca de ADNc amplificado se dejó en placas y las colonias se retiraron como se describió en el Ejemplo 13. Una sonda de ADN se realizó utilizando un fragmento de ADN NcoI/NotI en gel de agarosa purificado que contiene el gen delta-9 elongasa de Euglena gracilis, a partir de pKR906 (ID de SEC Nº: 115; Ejemplo 16 y WO 2007/061845, que se publicó el 31 de mayo 2.007; Expediente Fiscal Nº BB-1562) etiquetado con P^{32} dCTP utilizando el Sistema de etiquetado de ADN RadPrime (Nº 18428-011 de Cat., Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante.

Las capas de colonias se sondearon y los positivos se identificaron y se confirmaron como se describe en el Ejemplo 13. El plásmido de ADN se aisló y secuenció exactamente como se describe en el Ejemplo 2 y las secuencias se alinearon y compararon utilizando el Sequencher® (Versión 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). De esta forma, los clones se podrían categorizar en uno de dos grupos distintos basados en la secuencia del inserto (designados EaD9Elo1 y EaD9Elo2). Los clones representativos que contienen el ADNc para cada clase de secuencia eran escogidos para el estudio posterior, y las secuencias para cada plásmido representativo (pLF121-1 y pLF121-2) se muestran en la ID de SEC Nº: 250 y ID de SEC Nº: 251, respectivamente. La secuencia mostrada por una cadena de NNNN representa una región de la cola PoliA que no era secuenciada. Las secuencias de codificación para EaD9Elo1 y EaD9Elo2 se muestran en la ID de SEC Nº: 252 e ID de SEC Nº: 253, respectivamente. Las correspondientes secuencias de aminoácidos para EaD9Elo1 y EaD9Elo2 se muestran en la ID de SEC Nº: 254 y en la ID de SEC Nº: 255, respectivamente.

Ejemplo 37

Identificación de una delta-5 desaturasa de Euglena anabaena UTEX 373

El presente Ejemplo describe la identificación de una delta-5 desaturasa a partir de Euglena anabaena UTEX 373.

El eug1c de la biblioteca de ADNc amplificado se sembró y las colonias se retiraron como se describió en el Ejemplo 13. Se hizo una sonda de ADN utilizando un fragmento de ADN NcoI/NotI en gel de agarosa purificado que contiene el gen Euglena gracilis delta-5 desaturasa (EgD5; ID de SEC Nº: 267) a partir de pDMW367, descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877 (publicado el 29 de noviembre de 2007, Expediente Fiscal Nº BB1629), etiquetado con P^{32}.

Las capas de colonias se sondearon y las positivas se identificaron y confirmaron como se describió en el Ejemplo 13. El ADN plásmido se aisló y secuenció exactamente como se describe en el Ejemplo 2, y las secuencias se alinearon y compararon utilizando un Sequencher® (Versión 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Un clon representativo que contiene un ADNc (pLF119) se muestra en la ID de SEC Nº: 256 y el gen contenido en el ADNc fue denominado EaD5Des1. La secuencia de codificación para EaD5Des1 se muestra en la ID de SEC Nº: 257. La correspondiente secuencia de aminoácidos para EaD5Des1 se muestra en la ID de SEC Nº: 258.

Ejemplo 38

Construcción de vector de expresión de soja pKR1183 para expresión de una fusión génica de Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis Camp1491 delta-9 desaturasa (Híbrido 1-HGLA sintasa)

Una fusión en marco entre la Euglena anabaena delta-9 elongasa (EaD9Elo1; ID de SEC Nº: 252; Ejemplo 36), el enlazador rico en prolina de Euglena gracilis DHA sintasa 1 (EgDHAsyn1Link; ID de SEC Nº: 197; Ejemplo 6) y el CCMP1491 delta-8 desaturasa de Tetruetreptia pomquetensis (TpomDB; ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21; véase también la solicitud en trámite con la presente del cesionario de los solicitantes que tiene la publicación de patente

de EE.UU. Nº US 2008/0095915 (presentada el 22 de octubre de 2007; Expediente del Fiscal Nº BB-1574)) se construyó utilizando las condiciones descritas a continuación.

Se hizo una fusión inicial en marco entre la EaD9Elo1 y la EgDHAsyn1Link (EaD9elo EgDHAsyn1-Link), flanqueado por un sitio NcoI en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3', mediante amplificación por PCR. EaD9Elo1 (ID de SEC Nº: 252) se amplificó a partir de pLF121-1 (ID de SEC Nº: 250) con oligonucleótidos EaD9-5Bbs (ID de SEC Nº: 259) y EaD9-3fusion (ID de SEC Nº: 260), utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. La EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 197) se amplificó de una forma similar a partir de pKR1049 (Ejemplo 4) con oligonucleótidos EgDHAsyn1Link5fusion (ID de SEC Nº: 261) y MWG511 (ID de SEC Nº: 175). Los dos productos de PCR resultantes se combinaron y se volvieron a amplificar utilizando EaD9-5Bbs (ID de SEC Nº: 259) y MWG511 (ID de SEC Nº: 175) para formar EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link. La secuencia de la EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link se muestra en la ID de SEC Nº: 262. La EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link no contiene un codón de parada en marco secuencia arriba del sitio NotI en el extremo 3', y por lo tanto, un fragmento de ADN clonado en el sitio NotI puede dar lugar a una fusión en marco con la EgD9elo1-EgDHAsyn1Link si se elige el marco correcto. El EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link se clonó en el vector de clonado pCR-Blunt® utilizando el kit de clonado Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pLF124 (ID de SEC Nº: 263).

El fragmento de ADN BbsI/NotI de pLF124 (ID de SEC Nº: 263), que contiene EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de KS366 (ID de SEC Nº: 177; Ejemplo 23), que contiene el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina, para producir pKR1177 (ID de SEC Nº: 264).

El fragmento de ADN BamHI de pKR1177 (ID de SEC Nº: 264), que contiene EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link, se clonó en el fragmento de ADN BamHI de pKR325, descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2006/012325 para producir pKR1179 (ID de SEC Nº: 265).

El fragmento NotI a partir de pLF114-10 (Ejemplo 21; ID de SEC Nº: 165), que contiene TpomD8 se clonó en el fragmento NotI de pKR1179 (ID de SEC Nº: 265) para producir pKR1183 (ID de SEC Nº: 266; FIG. 28). En la FIG.28, el fusión génica (Híbrido1-HGLA sintasa) se denomina EAd9ELONG-TPOMd8DS.

Ejemplo 39

Construcción de vector de expresión pKR1253 de soja para expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa) con una Euglena gracilis delta-5 desaturasa

A través de una serie de etapas de subclonado, se añadió un sitio NotI al extremo 5' de la Euglena gracilis delta-5 desaturasa (EgD5; ID de SEC Nº: 267) a partir de pDMW367 y este fragmento NotI que contiene EgD5 se clonó en el sitio NotI de pKR457 (ID de SEC Nº: 122; Ejemplo 16) para producir pKR1237 (ID de SEC Nº: 268).

El fragmento AscI de pKR1183 (ID de SEC Nº: 266; Ejemplo 38), que contiene la Híbrido1-HGLA sintasa, se clonó en el fragmento AscI de pKR277 (ID de SEC Nº: 120, que fue descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2004/071467 y publicado el 26/8/2004; Expediente Fiscal Nº BB-1538 para producir pKR1252 (ID de SEC Nº: 269).

El fragmento BsiWI de pKR1237 (ID de SEC Nº: 268), que contiene el gen EgD5, se clonó en el sitio Bsi/WI de pKR1252 (ID de SEC Nº: 269) para producir PKR1253 (ID de SEC Nº: 270; FIG. 30).

Ejemplo 40

Construcción de de vector pKR1139 de soja para expresión de una Euglena anabaena delta-5 desaturasa

El presente ejemplo describe la clonación de una delta-5 desaturasa a partir de Euglena anabaena UTEX 373 en un vector de expresión de soja.

La EaD5Des1 (ID de SEC Nº: 257) se amplificó a partir de pLF119 (ID de SEC Nº: 256, Ejemplo 37) con oEAd5-1-1 (ID de SEC Nº: 271) y oEAd5-1-2 (ID de SEC Nº: 272), utilizando el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El Producto de PCR resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1136 (ID de SEC Nº:273).

El fragmento NotI para pKR1136 (ID de SEC Nº: 273) que contiene la EaD5Des1 se clonó en el fragmento NotI de pKR974, descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicado el 29 de noviembre de 2007 (Expediente Fiscal Nº BB-1629), para producir pKR1139 (ID de SEC Nº: 274).

Ejemplo 41

Construcción de vector de expresión pKR1255 de soja para expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa) con una Euglena gracilis delta-5 desaturasa y una Euglena anabaena delta-5 desaturasa

El plásmido pKR1139 (ID de SEC Nº: 274; Ejemplo 40) fue digerido con SbfI y el fragmento que contiene la EaD5Des1 se clonó en el sitio SbfI de pKR1253 (ID de SEC Nº: 270; Ejemplo 39) para producir pKR1255 (ID de SEC Nº: 275; FIG. 31).

Ejemplo 42

Construcción de vector de expresión pKR1189 de soja para regulación reductora de la expresión de Fad3 de soja

El presente Ejemplo describe un vector de expresión de soja diseñado para disminuir la expresión de Fad3 en la soja.

Un vector pKR561 de partida (ID de SEC Nº: 276) fue montado por inserción del fragmento BsiWI de pKR268 (descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 04/071467) que contiene el promotor de anexina en el sitio BsiWI de pKR145, que se describe en la publicación PCT Nº WO 04/071467.

El plásmido XF1, descrito en la publicación PCT Nº WO 93/11245 (que fue publicada el 10 de junio de 1993; también patente de EE.UU. Nº 5.952.544), contiene el gen (Fad3) delta-15 desaturasa de soja (ID de SEC Nº: 277; Nº L22964 de acceso al Banco de Genes; también denominado GmFAD3B).

Una porción del extremo 5' del gen fad3 se amplificó a partir de XF1 con ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante, utilizando HPfad3-1 (ID de SEC Nº: 278) y HPfad3-2 (ID de SEC Nº: 279) para producir un fragmento de ADN denominado HPfad3AB (ID de SEC Nº: 280).

Una porción del extremo 3' del gen fad3 se amplificó a partir de XF1 con el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion®, utilizando HPfad3-3 (ID de SEC Nº: 281) y HPfad3-1 (ID de SEC Nº: 278) para producir un fragmento de ADN denominado HPfad3A'-2 (ID de SEC Nº: 282).

HPfad3AB y HPfad3A'-2 se combinaron y amplificaron utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® con HPfad3-1 (ID de SEC Nº: 278) para producir HPfad3ABA'-2 (ID de SEC Nº: 283). HPfad3ABA'-2 (ID de SEC Nº: 283) tiene un sitio NotI tanto en el extremo 5' como en el 3' del fragmento de ADN. El producto de PCR resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pLF129 (ID de SEC Nº: 284).

El fragmento NotI para pLF129 (ID de SEC Nº: 284) que contiene la horquilla fad3 se clonó en el fragmento NotI de pKR561 (ID de SEC Nº: 276) para producir pKR1189 (ID de SEC Nº: 285; FIG. 32). En la FIG. 32, los dominios A y A' para fad3 se indican mediante la designación TR1 mientras que el dominio B se indica mediante TR2.

Ejemplo 43

Construcción de vector de expresión pKR1249 de soja para regulación reductora de Fad3 de Soja y de Fad3c de soja

El fragmento NotI/HindIII de pLF129 (ID de SEC Nº: 284) que contiene los dominios TR1 y TR2 de fad3, como se indica en la FIG. 32, se clonó en el fragmento NotI/HindIII de la cadena principal de pLF129 (ID de SEC Nº: 284) para producir pKR1209 (ID de SEC Nº: 286).

La secuencia de codificación de GmFad3C (Nº AY204712 de acceso al Banco de Genes) (Bilyeu et al., Crop Sci. 43: 1833-1838 (2003); Anai et al., Plant Sci. 168: 1615-1623 (2005)) se muestra en la ID de SEC Nº: 287 y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en la ID de SEC Nº: 288. Una porción del gen fad3c se amplificó a partir de la biblioteca de ADNc de soja descrita en la publicación PCT Nº WO 93/11245 (que se publicó el 10 de junio de 1993; también la patente de EE.UU. Nº 5.952.544) con el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante, utilizando fad3c-5 (ID de SEC Nº: 289) y fad3c-3 (ID de SEC Nº: 290) El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1213 (ID de SEC Nº: 291).

El fragmento EcoRV/XhoI de pKR1213 (ID de SEC Nº: 291) que contiene el fragmento de fad3c se clonó en el sitio NotI (rellenado)/XhoI de pKR1209 (ID de SEC Nº: 286) para producir pKR1218 (ID de SEC Nº: 292).

El fragmento NotI/HindIII de pLF129 (ID de SEC Nº: 284) que contiene el dominio TR1 solo de Fad3, como se indica en la FIG. 32, se clonó en el fragmento NotI/HindIII de la cadena principal de pLF129 (ID de SEC Nº: 284) para producir pKR1210 (ID de SEC Nº: 293).

El fragmento EcoRV/XhoI de pKR1213 (ID de SEC Nº: 291) que contiene el fragmento de fad3c se clonó en el sitio NotI (rellenado)/XhoI de pKR1210 (ID de SEC Nº: 293) para producir pKR1219 (ID de SEC Nº: 294).

El fragmento XhoI(rellenado)/HindIII de pKR1218 (ID de SEC Nº: 292) que contiene el fragmento de fad3c así como los dominios TR1 y TR2 de fad3 se clonó en el sitio MauI(rellenado)/HindIII de pKR1219 (ID de SEC Nº: 294), que

contiene el fragmento de fad3c así como el único dominio fad3 TR1, para producir pKR1225 (ID de SEC Nº: 295). De esta forma, se formó una nueva horquilla que incluye Fad3 y fad3c y flanqueada por sitios NotI.

El fragmento NotI para pKR1225 (ID de SEC Nº: 295) que contiene la nueva horquilla que incluye Fad3 y fad3c se clonó en el fragmento NotI de pKR561 (ID de SEC Nº: 276; Ejemplo 42) para producir pKR1229 (ID de SEC Nº: 296; FIG. 33). De esta forma, la horquilla Fad3/fad3c puede ser expresada a partir de un promotor fuerte específico de la semilla con la selección de higromicina en plantas.

El fragmento BsiWI para pKR1225 (ID de SEC Nº: 295) que contiene la nueva horquilla que incluye Fad3 y fad3c se clonó en el fragmento BsiWI de pKR226 (ID de SEC Nº: 130; Ejemplo 17) para producir pKR1249 (ID de SEC Nº: 297; FIG. 34).En la FIG. 34, el pKR1249 es etiquetado pKR1249_PHP33240. De esta forma, la horquilla fad3/fad3c puede ser expresada a partir de un promotor fuerte específico de la semilla con selección con clorosulfurón (ELA) en Plantas.

Ejemplo 44

Construcción de vector de expresión pKR1322 de soja para expresión de una fusión génica de Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa Euglena anabaena delta-5 desaturasa (fusión EaD9Elo1-TpomD8-EaD5Des1)

El presente ejemplo describe la construcción de una fusión génica en marco entre la Euglena anabaena delta-9 elongasa (EaD9Elo1; ID de SEC Nº: 252, Ejemplo 36), la Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8; ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21) y la Euglena anabaena delta-5 desaturasa (EaD5Des1; ID de SEC Nº: 257; Ejemplo 37). Cada Dominio está separado por el enlazador EgDHAsyn1 (EgDHAsyn1Link; ID de SEC Nº: 197; Ejemplo 6).

La EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 262; Ejemplo 38) se amplificó a partir pLF124 (ID de SEC Nº: 263) con oligonucleótidos oEAd9el1-1 (ID de SEC Nº: 298) y oLINK-1 (ID de SEC Nº: 299), utilizando el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link está flanqueado por NotI en el extremo 5’ y por EagI en los extremos 5' y 3’ y no contiene un codón de parada en marco secuencia arriba del sitio EagI en el extremo 3'. Por lo tanto, un fragmento de ADN clonado en el sitio EagI puede dar lugar a una fusión en marco con EgD9elo-EgDHAsyn1Link si se elige el marco correcto. El fragmento de ADN resultante que contiene EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1298 (ID de SEC Nº: 300).

Se hizo una fusión en marco entre la TpomD8 y la EgDHAsyn1Link (TpomDB-EgDHAsyn1Link) que contiene un sitio NotI en el extremo 5’ y sitios EagI en los extremos 5' y 3’, mediante amplificación por PCR. TpomD8 (ID de SEC Nº: 162) se amplificó a partir de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165) con oligonucleótidos oTPd8-1 (ID de SEC Nº: 301) y oTPd8fus-1 (ID de SEC Nº: 302), utilizando el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 197) se amplificó de una forma similar a partir de pKR1049 (Ejemplo 4) con oligonucleótidos oLINK-2 (ID de SEC Nº: 303) y oLINK-1 (ID de SEC Nº: 304). Los dos productos de PCR resultantes se combinaron y se reamplificaron utilizando oTPd8-1 (ID de SEC Nº: 301) y oLINK-1 (ID de SEC Nº: 304) para formar TpomD8-EgDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 305) TpomD8-EgDHAsyn1Link se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1291 (ID de SEC Nº: 306).

El fragmento EagI de pKR1291, que contiene el TpomDB-EgDHAsyn1Link se clonó en el sitio NotI del vector SK(+) pBluescript II (Stratagene) para formar bien pKR1301 (ID de SEC Nº: 307) en una orientación o bien pKR1301R (ID de SEC Nº: 308) en la orientación opuesta.

El plásmido pKR1301 (ID de SEC Nº: 307) fue digerido con MfeI/BamHI, el fragmento de ADN que contiene TpomD8-EgDHAsyn1Link estaba rellenado completamente, y el fragmento de ADN resultante se volvió a ligar para formar pKR1311 (ID de SEC Nº: 309).

El plásmido pKR1301R (ID de SEC Nº: 308) fue digerido con EcoRI, y el fragmento que contiene el extremo 5’ de TpomD8-EgDHAsyn1Link (denominado TPOMD8TR2) y el vector de la cadena principal se volvió a ligar para formar pKR1304 (ID de SEC Nº: 310).

El sitio EagI de pKR1298 (ID de SEC Nº: 300) que contiene el EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link se clonó en el sitio EagI de pKR1304 (ID de SEC Nº: 310) para producir pKR1309 (ID de SEC Nº: 311).

El sitio NotI de pKR1298 (ID de SEC Nº: 300) que contiene el EaD9Elo1-EgDHAsyn1Link se clonó en el sitio EagI de pKR1304 (ID de SEC Nº: 310) para producir pKR1309 (ID de SEC Nº: 311).

El fragmento NotI para pKR1136 (ID de SEC Nº: 273; Ejemplo 40) que contiene el EaD5Des1 se clonó en el sitio EagI de pKR1311 (ID de SEC Nº: 309) para producir pKR1313 (ID de SEC Nº: 312).

El fragmento MfeI/Ec/136II de pKR1313 (ID de SEC Nº: 312) se clonó en los sitios EcoRV/MfeI de pKR1309 (ID de SEC Nº: 311) para producir pKR1315 (ID de SEC Nº: 313).

El fragmento NotI de pKR1315 (ID de SEC Nº: 313) se clonó en el sitio NotI de pKR72 (ID de SEC Nº: 105; Ejemplo 15) para producir pKR1322 (ID de SEC Nº: 314; FIG. 35).

En la FIG. 35, la fusión EaD9Elo1-TpomD8-EaD5Des1 es etiquetada como fusión EAd9el+TPd8ds+EAd5ds.

Ejemplo 45

Regulación reductora de los genes fad3 y fad3c de la soja en embriones somáticos de soja por transformación con pKR1189 o pKR1229

El presente ejemplo describe la transformación y expresión en embriones somáticos de soja de pKR1189 (ID de SEC Nº: 285, Ejemplo 42), que contiene un constructor de horquilla fad3 o pKR1229 (ID de SEC Nº: 296; Ejemplo 43), que contiene un constructo de horquilla fad3 y fad3c. Ambos constructos también tienen el gen higromicina fosfotransferasa para la selección en higromicina.

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con pKR1189 (ID de SEC Nº: 285) o pKR1229 (ID de SEC Nº: 296) y los embriones fueron madurados en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medios líquidos SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24:393 (2005)) como se describe en el Ejemplo 25 y descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicada el 29 de noviembre de 2007.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, los embriones individuales eran retirados de los agrupamientos, se secaron y se cribaron para alteraciones en sus composiciones de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 1. En cada caso, un subconjunto de embriones de soja (es decir, cinco embriones por caso) transformadas bien con pKR1189 (ID de SEC Nº: 285) o bien con pKR1229 (ID de SEC Nº: 296) se recolectaron y se analizaron.

De esta forma, se analizaron 41 casos transformados con pKR1189 (ID de SEC Nº: 285; Experimento 2148) o pKR1229 (ID de SEC Nº 296; Experimento 2165). Los perfiles de ácidos grasos para los cinco casos que tienen el contenido de ALA promedio más bajo (promedio de los 5 embriones analizados) junto con un caso (2148-3-8-1) que tiene un perfil de ácidos grasos típico de los embriones de tipo silvestre para este experimento, como se muestra en la FIG. 36. En la FIG. 36, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA y ALA. Las composiciones de ácidos grasos son expresadas como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

Contenido de ALA en embriones somáticos que expresan bien un constructor de horquilla Fad3 (caso número 2148, FIG. 36) o un constructor de horquilla fad3c (caso número 2165, FIG. 36) mostraron al menos una reducción del 50% en comparación con típicos embriones de tipo silvestre (FIG. 36). Esto indica claramente que cualquier constructo en horquilla es funcional para disminuir el contenido de ALA en los embriones de soja.

Ejemplo 46

Embriones somáticos de soja transformados con pKR1183 para expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa)

El presente ejemplo describe la transformación y expresión en embriones somáticos de soja de pKR1183 (ID de SEC Nº: 266; Ejemplo 38) que contiene el fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (HGLA Hybrid1-sintasa) y el gen higromicina fosfotransferasa para la selección en higromicina.

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con pKR1183 (ID de SEC Nº: 266) y los embriones fueron madurados en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medios líquidos SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24:393 (2005)) como se describe en el Ejemplo 25 y descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicada el 29 de noviembre de 2007.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, un subconjunto de embriones de soja (es decir, cuatro embriones por caso) transformados con pKR1183 (ID de SEC Nº: 266) fueron recolectados y analizados como se describe en el presente documento.

De esta forma, se analizaron 20 casos transformados con pKR1183 (ID de SEC Nº: 266; Experimento 2145). Los perfiles de ácidos grasos de los cinco casos que tienen el contenido de DGLA con mayor promedio (promedio de los 5 embriones analizados) se muestran en la FIG. 37. En la FIG. 37, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y ETA. Las composiciones de los ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

Ejemplo 47

Embriones de soja transformados con vectores de expresión PKR1253 de soja para expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa) con Euglena gracilis delta-5 desaturasa y pKR1249 para regulación reductora del fad3 de soja y del fad3c de soja

El cultivo de suspensión embriogénica de soja se transformó con los fragmentos AscI de pKR1249 (ID de SEC Nº: 297; Ejemplo 43) y pKR1253 (ID de SEC Nº: 270; Ejemplo 39) (cv. Jack) como se describe en el Ejemplo 25. Un subconjunto de embriones de soja generados a partir de cada caso (diez embriones por caso) se recolectaron, recogieron en viales de vidrio para CG y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) por transesterificación y se analizaron por CG como se describe en el Ejemplo 1. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los patrones disponibles comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc).

De esta forma, se analizaron 142 casos transformados con pKR1249 (ID de SEC Nº: 297) y pKR1253 (ID de SEC Nº: 270) (experimento denominado Heal 25). De los 142 casos analizados, se identificó que 90 producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 1,0% de los ácidos grasos totales. De estos, se identificó que 64 producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 10,0% de los ácidos grasos totales. De estos, se identificaron 44 casos que producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 20,0% de los ácidos grasos totales.

Los perfiles promedio de ácidos grasos (Promedio de 10 embriones) para 20 casos que tienen el mayor ARA se muestran en la FIG. 38. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA; y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 38 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Para la FIG. 38, los ácidos grasos listados como "otros" incluyen: 18:2 (5, 9), 18:3 (5,9,12), STA, 20:0, 20:1(11), 20:2(7, 11) o 20:2(8,11) y DPA. Cada uno de estos ácidos grasos está presente con una abundancia relativa de menos que 2,0% de los ácidos grasos totales. El ácido graso omega-3 total promedio (n-3 total) es la suma de los promedios de todos los ácidos grasos omega-3).

Los perfiles reales de ácidos grasos para cada embrión a partir de un caso (AFS 5416-8-1-1) que tiene un contenido de ARA promedio de 17,0% y un contenido de EPA promedio de 1,5% se muestra en la. FIG. 39. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA; y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 39 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Para la FIG. 39, los ácidos grasos listados como "otros" incluyen: 18:2 (5, 9), 18:3(5, 9, 12), STA, 20:0, 20:1(11), 20:2(7, 11) o 20:2(8, 11) y DPA. Cada uno de estos ácidos grasos está presente con una abundancia relativa de menos que 2,0% de los ácidos grasos totales. El ácido graso omega-3 total (n-3 total) es la suma de todos los ácidos grasos omega-3).

Debido a que el contenido de ALA es generalmente de 1,5 a 3 veces mayor en los embriones somáticos de soja de lo que está en la semilla (es decir, 15%-30% en los embriones (véase, por ejemplo, típico embrión de tipo silvestre en la FIG. 36), dependiendo de las condiciones de maduración y del tiempo frente a 10,7% en una semilla (Bilyeu et al., 2005, Crop Sci. 45: 1830-1836), se espera que los contenidos de omega-3 en general y los contenidos de EPA específicamente, serán significativamente menores en semillas que en embriones somáticos.

Ejemplo 48

Embriones de soja transformados con vectores de expresión pKR1255 de soja para expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa) con Euglena gracilis delta-5 desaturasa y Euglena anabaena delta-5 desaturasa y PKR1249 para regulación reductora de fad3 de soja y fad3c de soja

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv Jack) se transformó con los fragmentos AscI de pKR1249 (ID de SEC Nº: 297; Ejemplo 43) y pKR1255 (ID de SEC Nº: 275; Ejemplo 41) como se describe en el Ejemplo 25. Un subconjunto de embriones de soja generados a partir de cada caso (diez embriones por caso) fueron recolectados, recogidos en viales de vidrio para CG y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) por transesterificación y se analizaron mediante CG como se describe en el Ejemplo 1. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los patrones disponibles comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc).

De esta forma, se analizaron 197 casos transformados con pKR1249 (ID de SEC Nº: 297) y pKR1255 (ID de SEC Nº: 275) (experimento denominado Heal 26). De los 197 casos analizados, se identificó que 128 producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 1,0% de los ácidos grasos totales. De estos, se identificó que 105 producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 10,0% de los ácidos grasos totales. Y de estos, se identificaron 83 casos que producían ARA en al menos un embrión de los diez analizados con una abundancia relativa mayor que 20,0% de los ácidos grasos totales.

Los perfiles promedio de ácidos grasos (Promedio de 9 o 10 embriones) para 20 casos que tienen el mayor ARA se muestran en la FIG. 40. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUN, ETA y EPA; y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 40 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. Para la FIG. 40, los ácidos grasos listados como "otros" incluyen: 18:2 (5, 9), 18:3(5, 9, 12), STA, 20:0, 20:1(11), 20:2(7, 11) o 20:2 (8, 11) y DPA. Cada uno de estos ácidos grasos está presente con una abundancia relativa de menos que 2,0% de los ácidos grasos totales. El ácido graso omega-3 total promedio (n-3 total) es la suma de los promedios de todos los ácidos grasos omega-3).

Ejemplo 49

Expresión de la fusión del dominio Euglena gracilis DHA sintasa 1 elongasa C20 / Schizochytrium aggregatum delta-4 desaturasa (EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4) transformados con vector de expresión pKR1134 de soja

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con el fragmento AscI de pKR1134 (ID de SEC Nº: 161; Ejemplo 20; fragmento que contiene el casete de expresión) y los embriones fueron madurados como se describe para la producción en el Ejemplo 25. La alimentación al sustrato de EPA y el análisis se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 35.

De esta forma, se analizaron 198 casos transformados con pKR1134 (denominado experimento Heal24). De los 198 casos analizados, se identificó que 193 alargaban EPA (actividad C20/delta-5 elongasa) y todos estos desaturaban DPA (delta-4 desaturasa) para producir DHA en cierta medida. Los casos con las mejores actividades C20/delta-5 elongasa y delta-4 desaturasa fueron avanzados y los perfiles de ácidos grasos de la alimentación de los embriones con EPA se muestran en la FIG. 41.

Los ácidos grasos en la FIG. 41 se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (esteárico ácido), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EPA, 22:0 (ácido docosanoico), DPA, 24:0 (ácido tetracosanoico), DHA y 24:1 (ácido nervónico); y las composiciones de ácidos grasos listados en la FIG. 41 se expresan como porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. La actividad de la EgDHAsyn1C20EloDom1 se expresa como porcentaje de elongación de C20/delta-5 (% de elong. C20/delta-5), calculado según la siguiente fórmula:

([producto]/[sustrato+producto])*100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado para EPA se muestra como "% de elong. C20/delta-5", determinado como: ([DPA+DHA]/[EPA+DPA+DHA])*100.

La actividad de la SaD4 se expresa como porcentaje de desaturación delta-4 (% de desat. delta-4), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto])*100. Más específicamente, el porcentaje de desaturación combinado para DPA se muestra como "% de desat. delta-4", determinado como: (DHA/[DPA+DHA])*100.

Además de los 122 casos analizados para la soja transformados con pKR1105 con (experimento denominado Heal23) como se describe en el Ejemplo 35, se analizaron 20 casos más ya que el Ejemplo 35 fue redactado llevando el total analizado para 142 casos. De los 20 nuevos casos analizados, se identificó que 18 alargaban EPA (actividad C20/delta-5 elongasa) y 17 de estos también desaturaban DPA (actividad delta-4 desaturasa) para producir DHA en cierta medida. Los casos con las mejores actividades C20/delta-5 elongasa y delta-4 desaturasa de los 20 nuevos casos analizados para la soja transformada con pKR1105 fueron avanzados y los perfiles de ácidos grasos de alimentar embriones con EPA se muestran en la FIG. 42.

Las actividades relativas de casos transformados bien con pKR1105 (elongasa C20 y delta-4 desaturasa expresadas individualmente) o bien con pKR1134 (elongasa C20 y delta-4 desaturasa expresadas como una fusión) son comparadas representando % de DHA (% en peso) frente a % de DPA (% en peso) para todos los casos donde los embriones se alimentaban con EPA. Los resultados se representan en la FIG. 43. En la FIG. 43, heal23 es el nombre del experimento donde pKR1105 se transformó y Heal24 es el experimento donde pKR1134 se transformó. De la FIG. 43, es evidente que, en general, las concentraciones de DHA han aumentado, mientras que las concentraciones de DPA han disminuido (tan bajo como indetectable), cuando la elongasa C20 se fusiona con la delta-4 desaturasa. Así, al fusionar entre sí las 2 enzimas independientes como una proteína de fusión, separadas por una región enlazadora, aumentaba el flujo de EPA a DHA.

Ejemplo 50

Expresión de una fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa-Euglena anabaena delta-5 desaturasa (fusión EaD9Elo1-TpomD8-EaD5Des1)

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transforma con pKR1322 (ID de SEC Nº: 314) y los embriones son madurados y analizados para perfiles de ácidos grasos como se describe en el presente documento.

Los embriones somáticos de soja transformados con pKR1322. (ID de SEC Nº: 314) alargarán un LA a EDA, EDA se desaturará a DGLA, y DGLA será desaturado adicionalmente a ARA. Debido a que la soja de tipo silvestre contiene también ALA, algunos ALA se alargarán a ERA, ERA se desaturará a ETA y ETA se desaturará más a EPA.

Las plantas de soja que expresan el fusión génica de pKR1322 pueden ser regeneradas a partir de embriones como se describe en el Ejemplo 26 y se pueden obtener las semillas.

En antecedentes que contienen elevado ALA, o donde se ha co-expresado una delta-15 desaturasa y/o delta-17 desaturasa, predominará EPA. Por el contrario, ARA puede enriquecerse mediante el uso de un antecedente bajo en ALA (por ejemplo, mediante el cruce con una planta baja en ALA o baja en linoleico), o desactivando el gen (o genes) endógeno fad3 como se describió en el presente documento. Los ácidos grasos intermedios (es decir, EDA y DGLA o ERA y ETA) serán menores cuando se utiliza fusión que cuando las actividades individuales son transformadas de forma independiente (es decir, sin una fusión).

Otras combinaciones de genes (que incluye combinaciones con enlazador) pueden fusionarse juntas de una forma similar a la descrita en el Ejemplo 24. De forma similar, pueden hacerse otras combinaciones de promotor/fusión génica/terminador.

Ejemplo 51

Determinación del dominio funcional en la delta-4 desaturasa sintética derivada de Euglena anabaena y de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (EaD4S)

Como se representa esquemáticamente en un diagrama en la FIG. 52C, la porción C-terminal del dominio de la elongasa C20 de EaDHAsyn1 (etiquetada como "EaC20E" en la figura) parece solaparse con la porción N-terminal del dominio delta-4 desaturasa de EaDHAsyn1 (etiquetado como "EaD4" en el figura). Esto es sugerido por la comparación de secuencias.

Con el fin de definir el dominio funcional delta-4 desaturasa en EaD4S (ID de SEC Nº: 192; Ejemplo 34), se generaron tres EaD4S* Mutantes con diferentes truncamientos N-terminales. Específicamente, pZuFmEaD4S (ID de SEC Nº: 364) se construyó reemplazando el fragmento NcoI/NotI de pZuFmIgD9ES (ID de SEC Nº: 365) con el fragmento NcoI/NotI EaD4S de pEaD4S (ID de SEC Nº: 196; Ejemplo 34). Un sitio NcoI se introdujo en pZuFmEaD4S (ID de SEC Nº: 364) por mutagénesis dirigida al sitio utilizando pares de cebadores YL921 y YL922 (ID de SEC Nº: 366 y 367, respectivamente), YL923 e YL924 (ID de SEC Nº: 368 y 369, respectivamente) e YL925 e YL926 (ID de SEC Nº: 370 y 371, respectivamente) para generar pZuFmEaD4S-M1 (ID de SEC Nº: 372), pZuFmEaD4S-M2 (ID de SEC Nº: 373) y pZuFmEaD4S-M3 (ID de SEC Nº: 374), respectivamente. Se digirieron los plásmidos pZuFmEaD4S-M1, pZuFmEaD4S-M2 y pZuFmEaD4S-M3 con NcoI, y después se auto-ligaron para generar los constructos pZuFmEaD4S-1 (ID de SEC Nº: 375), pZuFmEaD4S-2 (ID de SEC Nº: 376) y pZuFmEaD4S-3 (ID de SEC Nº: 377). Los fragmentos NcoINotI que contienen diferentes truncamientos de EaD4S de pZuFmEaD4S-1, pZuFmEaD4S-2 y pZuFmEaD4S-3 se utilizaron para producir los constructos pZKL4-220EA4-1 (ID de SEC Nº: 378), pZKL4-220EA4-2 (ID de SEC Nº: 379) y pZKL4-220EA4-3 (ID de SEC Nº: 380). Estos tres constructos eran exactamente los mismos que pZKL4-220EA4 (ID de SEC Nº: 362 y la FIG. 52B, como se describe en la Tabla 28 del Ejemplo 34), excepto que la región codificante de EaD4S estaba truncada en la región N-terminal. Específicamente, en lugar de secuencia de codificación de EaD4S larga de 583 aminoácidos (ID de SEC Nº: 193), el polipéptido EaD4S* truncado tenía una longitud de 547 aminoácidos en pZKL4-220EA4-1 (es decir, ID de SEC Nº: 382), una longitud de 527 aminoácidos en pZKL4-220EA4-2 (es decir, ID de SEC Nº: 384) y una longitud de 512 aminoácidos en pZKL4-220EA4-3 (es decir, ID de SEC Nº: 386). La región N-terminal de estos polipéptidos (correspondiente a los aminoácidos 1-90 de la ID de SEC Nº: 193) están alineados en la FIG. 53A.

Los plásmidos pZKL4-220EA4 (ID de SEC Nº: 362), pZKL4-220EA4-1 (ID de SEC Nº: 378), pZKL4-220EA4-2 (ID de SEC Nº: 379) y pZKL4-220EA4-3 (ID de SEC Nº: 380) se digirieron con AscI/SphI, y después se transformaron en la cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después de un cultivo de 5 días a 30ºC, 5 transformantes cultivados en las placas de MM de cada constructo se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas de MM. Una vez desarrolladas, estas cepas eran inoculadas individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, los lípidos se extrajeron, y los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los resultados de CG se muestran a continuación en la Tabla 29. La composiciones de DPA y DHA se presentan como un % de los ácidos grasos totales. La eficiencia de transformación ("Efic. de la transf.") se midió según la fórmula siguiente: ([DHA]/[DPA+DHA])* 100. La actividad delta-4 desaturasa de cada EaD4S* truncada (es decir, los polipéptidos de 547 aminoácidos, 527 aminoácidos o 512 aminoácidos en los transformantes de Yarrowia PZKL4-220EA4-1, pZKL4-220EA4-2 y pZKL4-220EA4-3, respectivamente) se comparó con la de EaD4S (es decir, transformantes Yarrowia de pZKL4-220EA4) en la columna etiquetada "% actividad delta-4".

Tabla 29

Análisis funcional de EaD4S y variantes truncadas en cepa Y4184U4 de Yarrowia lipolytica					
Plásmido transformante	Longitud de delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº)	DPA (%)	DHA (%)	Efic. de la transf. (%)	% de actividad de delta-4
pZKL4-220EA4 (ID de SEC Nº:362)	583 AA (ID de SEC Nº: 193)	10,2	0,4	4,2	100
pZKL4-220EA4-1 (ID de SEC Nº:378)	547 AA (ID de SEC Nº: 382)	8,0	2,2	21,5	512
pZKL4-220EA4-2 (ID de SEC Nº: 379)	527 AA (ID de SEC Nº: 384)	11,5	1,8	13,2	314
pZKL4-220EA4-3 (ID de SEC Nº: 380)	512 AA (ID de SEC Nº: 386)	11,0	1,3	10,4	248

Estos datos mostraban que el N-terminal de los 37 aminoácidos de EaD4S (es decir, los aminoácidos 1-37 de la ID de SEC Nº: 193) tiene un efecto negativo sobre la actividad de la delta-4 desaturasa. La elevada actividad de la delta-4 desaturasa se mide con respecto a EaD4S en cada una de las proteínas truncadas EaD4S*, aunque los polipéptidos EaD4S* de 547 aminoácidos (ID de SEC Nº: 382) es superior en actividad en comparación con los polipéptidos EaD4S* que carecen de aminoácidos adicionales a partir de su N-término (es decir, ID de SEC Nº: 384 y 386).

Ejemplo 52

Síntesis y análisis funcional de un gen delta-4 desaturasa de codón optimizado (EgD4S) a partir de Euglena gracilis en Yarrowia lipolytica

El uso de codón del dominio delta-4 desaturasa de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 221) de Euglena gracilis (correspondiente a los aminoácidos 253-793 de ID de SEC Nº: 12) se ha optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica, de una forma similar a la descrita en la publicación PCT Nº WO 2004/101753, patente de Estados Unidos 7.125.672, y los Ejemplos 32, 33, y 34 en el presente documento. Específicamente, se diseñó un gen delta-4 desaturasa de codón optimizado (designado "EgD4S"; ID de SEC Nº: 387), basado en la secuencia de codificación del dominio delta-4 desaturasa de EgDHAsyn1, según el modelo de uso de codón de Yarrowia (publicación PCT Nº WO 2004/101753), la secuencia de consenso en torno al codón de iniciación de la traducción "ATG", y las reglas generales de estabilidad del ARN (Guhaniyogi, G. y J. Brewer, Gene, 265 (1-2): 11-23 (2001)). Además de la modificación del sitio de iniciación de la traducción, se modificaron 282 pb de la región de codificación de 1623 pb (17,4%) y se optimizaron 270 codones (49,9%). La región de codificación de codón optimizado de EgD4S tiene una longitud de 1623 pb, codificando por ello un polipéptido de 540 aminoácidos (ID de SEC Nº: 388). Así, EgD4S es un aminoácido de longitud más corta que el dominio delta-4 desaturasa de tipo silvestre de EgDHAsyn1 (es decir, ID de SEC Nº: 221; específicamente, el resto leucina que corresponde a la posición 2 de aminoácido de ID de SEC Nº: 13 se eliminó en EgD4S (ID de SEC Nº: 388). El gen EgD4S diseñado (ID de SEC Nº: 387) se sintetizó mediante GenScript Corporation (Piscataway, NJ) y se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes) para generar pEgD4S (ID de SEC Nº: 389).

Para analizar la función del gen EgD4S de codón optimizado, el plásmido pZKL4-220Eg4 (ID de SEC Nº: 390) se construyó para integrar dos genes quiméricos de elongasa C20 y el gen quimérico EgD4S en la lipasa 4 como locus (Nº XM_503825 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica. El plásmido pZKL4-220Eg4 (ID de SEC Nº: 390) era de construcción idéntica a la de plásmido pZKL4-220Ea4 (ID de SEC Nº: 362; FIG. 52B; Tabla 28 del Ejemplo 34), con la excepción de que se utilizó EgD4S (ID de SEC Nº: 387) en lugar de EaD4S (ID de SEC Nº: 192).

El plásmido pZKL4-220Eg4 fue digerido con AscI/SphI, y después se transformó en la cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas MM. Después de 5 días de cultivo a 30ºC, 14 transformantes cultivados en las placas de MM se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas MM recién preparadas. Una vez desarrolladas, estas cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos, y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había un promedio de 4,9% de DHA y 17,8% de DPA de los lípidos totales producidos en los 14 transformantes, en donde se determinó que la eficiencia de transformación de DPA a DHA era

de aproximadamente 21,5% (calculado como se describe en el Ejemplo 27). Así, estos datos experimentales mostraron que la Euglena gracilis delta-4 desaturasa de codón optimizado sintética para expresión en Yarrowia lipolytica (es decir, EgD4S, como se expone en ID de SEC Nº: 387) estaba activa para transformar un DPA a DHA

Ejemplo 53

Determinación del dominio funcional en delta-4 desaturasa sintética derivada de Euglena gracilis y de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica (EgD4S)

De una forma parecida a la observada en EaDHAsyn1 (FIG. 52C), la porción C-terminal del dominio de C20 elongasa de EgDHAsyn1 parece solaparse con la porción N-terminal del dominio delta-4 desaturasa de EgDHAsyn1, basado en la comparación de secuencias.

Con el fin de definir el dominio funcional delta-4 desaturasa en EgD4S (ID de SEC Nº: 387), se generaron tres mutantes EgD4S con diferentes truncamientos N-terminales. Un sitio NcoI se introdujo en pEgD4S (ID de SEC Nº: 389; Ejemplo 52) mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando pares de cebadores YL935 e YL936 (ID de SEC Nº: 391 y 392, respectivamente), YL937 e YL938 (ID de SEC Nº: 393 y 394, respectivamente) e YL939 e YL940 (ID de SEC Nº: 395 y 396, respectivamente) para generar los constructos pEgD4S-M1 (ID de SEC Nº: 397), pEgD4S-M2 (ID de SEC Nº: 398) y pEgD4S-M3 (ID de SEC Nº: 399), respectivamente Los fragmentos NcoI/NotI que contienen diferentes truncamientos de EgD4S a partir de pEgD4S-M1, pEgD4S-M2 y pEgD4S-M3 se utilizaron para generar los constructos pZKL4-220Eg4-1 (ID de SEC Nº: 400), pZKL4-220Eg4-2 (ID de SEC Nº: 401) y pZKL4-EgD4-3 (ID de SEC Nº: 402). Estos tres constructos eran exactamente iguales que pZKL4-220Eg4 (ID de SEC Nº: 390; Ejemplo 52), excepto que la región de codificación del EgD4S fue truncada en la región N-terminal. Específicamente, en lugar de la secuencia de codificación larga de 540 aminoácidos de EgD4S (ID de SEC Nº: 388), el polipéptido truncado EgD4S* tenía una longitud de 513 aminoácidos en pZKL4-220Eg4-1 (es decir, ID de SEC Nº: 404), una longitud de 490 aminoácidos en pZKL4-220Eg4-2 (es decir, ID de SEC Nº: 406) y una longitud de 474 aminoácidos en pZKL4-220Eg4-3 (es decir, ID de SEC Nº: 408). La región N-terminal de estos polipéptidos (correspondiente a los aminoácidos 1-80 de la ID de SEC Nº: 388) están alineados en la FIG. 53B.

Los plásmidos pZKL4-220Eg4 (ID de SEC Nº: 390), pZKL4-220Eg4-1 (ID de SEC Nº: 400), pZKL4-220Eg4-2 (ID de SEC Nº: 401) y pZKL4-EgD4-3 (ID de SEC Nº: 402) fueron digeridos con AscI/SphI, y después se transformaron en la cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica individualmente, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después de un cultivo de 5 días a 30ºC, 4 transformantes cultivados en las placas de MM de cada constructo se recogieron y se volvieron a rayar sobre placas de MM recién preparadas. Una vez desarrolladas, estas cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos, y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los resultados de CG se muestran a continuación en la Tabla 30. La composición de DPA y DHA se presentan como un% de los ácidos grasos totales. La Eficiencia de transformación ("Efic. de Transf..") se midió de acuerdo con la siguiente fórmula: ([DHA]/[DPA+DHA])*100. La actividad delta-4 desaturasa de cada EgD4S* truncada (es decir, los polipéptidos de 513 aminoácidos, 490 aminoácidos o 474 aminoácidos en transformantes Yarrowia de pZKL4-220Eg4-1, pZKL4-220Eg4-2 y pZKL4-220Eg4-3, respectivamente) se comparó con la de EgD4S (es decir, transformantes Yarrowia de pZKL4-220Eg4) en la columna etiquetada "% de actividad delta-4".

Tabla 30

Análisis funcional de EqD4S Y variantes truncadas en cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica					
Plásmido transformante	Longitud de delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº)	DPA (%)	DHA (%)	Efic. de la transf. (%)	% de actividad delta-4
pZKL4-220Eg4 (ID de SEC Nº: 390)	540 AA (ID de SEC Nº: 388)	17,8	4,9	21,5	100
pZKL4-220Eg4-1 (ID de SEC Nº: 400)	513 AA (ID de SEC Nº: 404)	16,5	4,6	21,6	100
pZKL4-220Eg4-2 (ID de SEC Nº: 401)	490 AA (ID de SEC Nº: 406)	16,8	3,8	18,5	86
pZKL4-220Eg4-3 (ID de SEC Nº: 402)	474 AA (ID de SEC Nº: 408)	24,7	2,4	8,8	41

Estos datos demostraban que el N-terminal de 28 aminoácidos de EgD4S* eran prescindibles (es decir, véase pZKL4-220Eg4-1, donde los primeros 28 aminoácidos de EgD4S estaban truncados y la proteína truncada expuesta como ID de SEC Nº: 404 retenía toda la actividad delta-4 desaturasa). La actividad reducida delta-4 desaturasa se midió en transformantes con pZKL4-220EgD4-2 y pZKL4-220EgD4-3, cuando los aminoácidos adicionales estaban truncados desde la porción 5' de las proteínas EgD4S, dando como resultado ID de SEC Nº: 406 e ID de SEC Nº: 408.

Ejemplo 54

Síntesis y análisis funcional de un gen EgDHAsyn1 de codón optimizado (EgDHAsyn1S) de Euglena gracilis en Yarrowia lipolytica

El plásmido pZKLY-G204 (FIG. 54A; ID de SEC Nº: 409) fue diseñado para integrar un gen quimérico que contiene una región de codificación EgDHAsyn1 de codón optimizado (es decir, EgDHAsyn1S, expuesta como ID de SEC Nº: 410 y 411) en la lipasa 7 locus (Nº AJ549519 de acceso al Banco de Genes) de la cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica. Además de la modificación del sitio de iniciación de la traducción, fueron modificadas 417 pb (17, 5%) de la región codificante de 2.382 pb, y 391 codones de 794 codones totales fueron optimizados (49,2%). La secuencia de aminoácidos de EgDHAsyn1S de codón optimizado (ID de SEC Nº: 411) es 100% idéntica a la secuencia de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12).

Para generar pZKLY-G204, se introdujo un sitio NotI en pEgC20ES (ID de SEC Nº: 185; véase la FIG. 51 B, Ejemplo 32) para generar pEgC20ES-K (ID de SEC Nº: 412; FIG. 54B) por mutagénesis dirigida al sitio utilizando oligonucleótidos YL973 e YL974 (ID de SEC Nº: 413 y 414, respectivamente) como cebadores y pEgC20ES como molde. Un fragmento Pme//NcoI de 732 pb que contiene el promotor YAT1 (publicación de patente de EE.UU. 2006/0094102-A1) de pYNTGUS1-CNP (FIG. 54C; ID de SEC Nº: 415), el fragmento NcoI/KpnI de 873 pb de pEgC20ES-K que contiene la porción N-terminal de codón optimizado de EgDHAsyn1S y el fragmento KpnI/NcoI de 1.512 pb de pEgD4S (ID de SEC Nº: 389; Ejemplo 52) que contiene la porción C-terminal de codón optimizado de EgDHAsyn1S fueron aislados, y después se utilizaron para reemplazar el fragmento PmeI/NotI de pZKLY (FIG. 54D; ID de SEC Nº: 416) para generar pZKLY-G204 (FIG. 54A). Así, pZKLY-G204 contenía los siguientes componentes:

Tabla 31

Componentes del plásmido pZKLY-G204 (ID de SEC Nº: 409)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº: 409	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
Asc I/BsiW I (1383-489)	Porción 5' de 887 pb del gen Lipasa 7 de Yarrowia (ID de SEC Nº: 417) (etiquetado como "LipY-5'" en la Figura; Nº AJ549519 de acceso al Banco de Genes)
PacI / SphI (4853-4091)	Porción 3' de 756 pb del gen Lipasa 7 de Yarrowia (ID de SEC Nº: 417) (etiquetado como "LipY-3'" en la Figura; Nº AJ549519 de acceso al Banco de Genes)
PmeI/BsiWI (7301-333)	YAT1 EgDHAsyn1S Lip1, que comprende: • YAT1: promotor YAT1 de Yarrowia lipolytica (publicación de patente Nº US 2006/0094102-A1); • EgDHAsyn1S: sintasa DHA de codón optimizado (ID de SEC Nº: 410), derivada de Euglena gracilis; • Lip1: secuencia de terminación Lip1 del gen Lip1 de Yarrowia (Nº Z50020 de acceso al Banco de Genes)
Sal I/EcoR I (6504-4885)	• gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)

El plásmido pZKLY-G204 fue digerido con AscI/SphI, y después se transformó en la cepa Y4305U3 de Yarrowia lipolytica, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después de 5 días de cultivo a 30ºC, 8 transformantes cultivados en las placas de MM fueron recogidos y se volvieron a rayar sobre placas de MM recién preparadas. Una vez desarrolladas, estas cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, se volvieron a suspender en HGM y después se agitaron a 250 rpm/min durante 5 días. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos, y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había aproximadamente 5,0% de DHA, 13,5% de DPA y 26,5% de EPA de los lípidos totales producidos en los 8 transformantes. La eficiencia de transformación de EPA a DPA y DHA se determinó que era de aproximadamente 41%; y la eficiencia de la transformación de DPA a DHA se determinó que

era de aproximadamente 27% en estas ocho cepas (calculado como se describe en el Ejemplo 27). Así, estos datos experimentales demostraron que la Euglena gracilis DHA sintasa de codón optimizado sintética para expresión en Yarrowia lipolytica (es decir, EgDHAsyn1S como se expone en la ID de SEC Nº: 410) contenía tanto actividad C20 elongasa como actividad delta-4 desaturasa. EgDHAsyn1S podría utilizar EPA como sustrato para producir DHA.

Ejemplo 55

Creación de genes de fusión delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa para expresión en Yarrowia lipolytica

Ccon el fin de mejorar la actividad de la enzima delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa en Yarrowia lipolytica, una serie de seis fusiones génicas delta-9 elongasa/delta-8 (multienzimas) son creadas en el presente Ejemplo, utilizando dos secuencias variantes del enlazador (es decir, ID de SEC Nº: 438 [GPARPAGLPPATYYDSLAV] e ID de SEC Nº: 445 [**GAG**PARPAGLPPATYYDSLA**VMGS**]) derivada del enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 198; PARPAGLPPATYYDSLAV).

Este trabajo requería: identificación de las apropiadas delta-9 elongasas y delta-8 desaturasas para expresión en Yarrowia lipolytica; y, construcción de plásmido pZUFmG9G8fu (que comprende una fusión génica EgD9ES/EgD8M), plásmido pZuFmG9G8fu-B (que comprende una fusión génica EgD9ES/EgD8M), plásmido pZUFmG9A8 (que comprende una fusión génica EgD9ES/EaD8S), plásmido pZUFmA9G8 (que comprende una fusión génica EaD9ES/EgD8M), plásmido pZUFmA9A8 (que comprende una fusión génica EaD9ES/EaD8S) y plásmido pZUFmR9G8 (que comprende una fusión génica E389D9eS/EgD8M). Todos los plásmidos compartían una cadena principal vector común y así fueron distinguidos sólo por la fusión génica que cada uno comprendía.

El análisis funcional de la actividad de cada fusión génica se prueba infra, en el Ejemplo 56.

Descripción de los genes sintéticos delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica

Los solicitantes han realizado considerables Análisis de varias delta-9 elongasas y delta-8 desaturasas, para determinar aquellas enzimas que tienen óptima especificidad por el sustrato y/o selectividad por el sustrato cuando se expresa en Yarrowia lipolytica. Basado en estos análisis, los genes descritos más adelante en la Tabla 32, y los genes de codón optimizado derivados de ellos (basado en la metodología de la patente de EE.UU. 7.125.672), se identificaron como preferidos para expresión en Y. lipolytica. Esos genes resaltados en texto en negrita fueron utilizados posteriormente para crear fusiones génicas de delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa.

Tabla 32

Desaturasas y elongasas preferidas para la creación de fusiones de genes delta-9/delta-8 en Yarrowia					
ORF	Organismo	Referencias de solicitudes de patente en trámite con la presente	Abreviatura del tipo silvestre y Nº de ID de SEC	Abreviatura del codón optimizado y Nº de ID de SEC	Abreviatura mutante y Nº de ID de SEC
Delta-9 elongasa	Euglena gracilis	publicación de patente de EE.UU. 2007-0117190 A1; véase también el Ejemplo 16 del presente documento	"EgD9e"* (ID de SEC Nº: 112)	"**EgD9eS**" (ID de SEC Nº: 318 y 319)	-
	Eutreptiella sp. CCMP389	publicación de patente de EE.UU. 2007-0117190 A1;	"E389D9e" (ID de SEC Nº: 419 y 420)	"**E389D9eS**" (ID de SEC Nº: 358 y 359)	-
	Euglena anabaena UTEX 373	Ejemplo 36 del presente documento	"EaD9e"* (ID de SEC Nº: 252 y 254)	"**EaD9eS**" (ID de SEC Nº: 421 y 422)	-

Desaturasas y elongasas preferidas para la creación de fusiones de genes delta-9/delta-8 en Yarrowia					
ORF	Organismo	Referencias de solicitudes de patente en trámite con la presente	Abreviatura del tipo silvestre y Nº de ID de SEC	Abreviatura del codón optimizado y Nº de ID de SEC	Abreviatura mutante y Nº de ID de SEC
Delta-8 desaturasa	Euglena gracilis	patente de EE.UU. 7.256.033; publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868	"EgD8"* (ID de SEC Nº: 423 y 424)	"EgD8S"* (ID de SEC Nº:425 y 426)	"**EgD8M**"* (ID de SEC Nº: 327 y 328)
	Euglena anabaena UTEX 373		"EaD8"* (ID de SEC Nº: 427 y 428)	"**EaD8S**" (ID de SEC Nº: 429 y 430)	-
* Notas: • EgD9e se describió como "EgD9elo" en el Ejemplo 16 del presente documento. • EaD9e se identificó como "EaD9Elo1" en el Ejemplo 36 del presente documento. • EgD8 se identificó como "Eg5" en la patente de EE.UU. 7.256.033. • EgD8S se identificó como "D8SF" en la patente de EE.UU. 7.256.033. • EgD8M se identificó como "EgD8S-23" en la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0138868.					

La eficiencia de transformación de LA a EDA de EgD9eS, E389D9eS y EaD9eS se informa en Cada una de las solicitudes citadas anteriormente. Brevemente, sin embargo, cuando cada delta-9 elongasa era expresada como un gen quimérico en la cepa Y2224 de Yarrowia lipolytica, bajo el control de una promotor FBAINm Yarrowia (publicación PCT Nº WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356) (FIG. 44) y una secuencia terminadora Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes), se midieron de forma independiente las siguientes transformaciones de sustrato: EgD9eS (20,1%); EaD9eS (13%); y E389D9eS (12%) Todos los genes sintéticos de codón optimizado funcionaban con mayor eficiencia de transformación de sustrato que el gen de tipo silvestre correspondiente.

La patente de EE.UU. 7.256.033 describe una E. gracilis delta-8 desaturasa ("EgD8") capaz de desaturar EDA y ETRA a DGLA y ETA, respectivamente, así como una delta-8 desaturasa sintética derivada de EgD8 y de codón optimizado para expresión en Yarrowia lipolytica ("EgD8S"). A pesar de la utilidad de EgD8 y EgD8S, una delta-8 desaturasa mutante diseñada sintéticamente identificada en el presente documento como EgD8M (ID de SEC Nº: 327 y 328) se utiliza en realizaciones más preferidas para expresión en Yarrowia lipolytica. Como se describió en la publicación de patente de EE.UU. Nº 2008/0138868, "EgD8M" (identificada allí como "EgD8S-23") se creó haciendo múltiples rondas de mutaciones dirigidas dentro de EgD8S. El efecto de cada mutación sobre la actividad de delta-8 desaturasa del mutante resultante se cribó para garantizar la equivalencia funcional con la actividad de delta-8 desaturasa de EgD8S (ID de SEC Nº: 426). Como resultado de este trabajo, EgD8M mutante (ID de SEC Nº: 328) comprende las siguientes mutaciones de 24 aminoácidos con respecto a la secuencia sintética EgD8S de codón optimizado expuesta como ID de SEC Nº: 426: 4S a A, 5K a S, 12T a V, 16T a K, 17T a V, 66P a Q, 67S a A, 108S a L, 117G a A, 118Y a F, 120L a M, 121M a L, 125Q a H, 126M a L, 132V a L, 133 L a V, 162L a V, 163V a L, 293L a M, 407A a S, 408V a Q, 418A a G, 419G a A y 422L a Q. El alineamiento de pares adecuados de las secuencias de proteínas EgD8M y EgD8S utilizando parámetros por defecto del programa AlignX de Vector NTI® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), reveló 94,3% de identidad de secuencia y 97,9% de consenso entre las dos proteínas sobre una longitud de 422 aminoácidos. La transformación promedio de sustrato de EDA a DGLA mediante esta delta-8 desaturasa mutante se determinó que era de 37%, cuando EgD8M se expresaba en la cepa Y4001 de Yarrowia lipolytica (FIG. 44), bajo el control de un promotor FBAINm de Yarrowia (publicación PCT Nº WO 2005/049805; Patente de EE.UU. 7.202.356) y una secuencia de terminador Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes).

Cuando EaD8S se expresaba en la cepa Y4001U de Yarrowia lipolytica (FIG. 44), bajo el control de un promotor FBAINm de Yarrowia (Patente de EE.UU. 7.202.356) y una secuencia terminadora Pex20 a partir del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes), había una eficiencia de transformación de 41% a DGLA con EDA endógena como sustrato.

Generación de constructo pZUFmEgD9ES-Na,.que comprende EgD9ES

El plásmido PZuFmEgD9ES (ID de SEC Nº: 431), que fue descrito previamente en la publicación de patente de EE.UU. 2007-0117190 A1, comprende un gen quimérico FBAINm::EgD9ES::Pex20, un plásmido ColE1 origen de

replicación, un gen con resistencia a la ampicilina (Amp^R) para selección en E. coli, una secuencia de replicación autónoma de Yarrowia (ARS18; Nº A17608 de acceso al Banco de Genes), y un gen Ura 3 Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes).

Un sitio Nar I se introdujo en pZuFmEgD9ES para generar pZuFmEgD9ES-Na (ID de SEC Nº: 432) utilizando oligonucleótidos YL989 y YL990 (ID de SEC Nº: 433 y 434, respectivamente) como cebadores y pZuFmEgD9ES como molde. El sitio Nar I introducido (es decir, GGCGCC) está situado justo antes del codón de parada de la traducción de EgD9ES; por lo tanto, la región de codificación del EgD9ES se amplió con dos aminoácidos adicionales (es decir, una glicina y una alanina).

Generación de constructo pZUFmG9G8fu, que comprende una fusión génica EgD9ES/EgD8M

La porción N-terminal de EgD8M (ID de SEC Nº: 327) se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos YL991 y YL992 (ID de SEC Nº: 435 y 436, respectivamente) como cebadores y pK02UFm8A. (ID de SEC Nº: 437) como molde. El oligonucleótido YL991 contenía un sitio Nar I en su extremo 5' y secuencia de ADN que codifica una variante modificada del enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 (es decir, GPARPAGLPPATYYDSLAV, como se expone en la ID de SEC Nº: 438 frente a PARPAGLPPATYYDSLAV, como se expone en La ID de SEC Nº: 198) Este enlazador poseía una glicina adicional en el extremo 5', con respecto al enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 198).

El NarI/BgIII digirió el producto de PCR que comprende la porción 5' de EgD8M y el BgIII/NotI digirió el fragmento de pKO2UFm8A que comprende la porción 3' de EgD8M se utilizó para reemplazar el fragmento NarI/NotI de pZUFmEgD9ES-Na para generar pZUFmG9G8fu (FIG. 55A), que de ese modo contenía los siguientes componentes:

Tabla 33

Componentes del plásmido pZUFmG9G8fu (ID de SEC Nº: 439)	
Sitios de RE y nucleótidos dentro de la ID de SEC Nº:439	Descripción de los componentes de fragmentos y genes quiméricos
Swa I/BsiW I (6067-318)	FBAINm EgD9ES/EgD8M Pex20, que comprende: • FBAINm: promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica (WO 2005/049805; patente de EE.UU. 7.202.356); • EgD9ES/EgD8M: fusión de genes que comprende delta-9 elongasa (EgD9ES) de codón optimizado de Euglena gracilis, un enlazador modificado derivado de EgDHAsyn1, y la delta-8 desaturasa mutante sintética derivada de Euglena gracilis (EgD8M) (EgD8M es etiquetado como "EgD8-23" en the Figura) (la secuencia de nucleótidos de l fusión de genes de longitud completa se expone en ID de SEC Nº: 440, mientras que la secuencia de aminoácidos traducida se expone como ID de SEC Nº: 441); • Pex20: secuencia de terminación Pex20 del gen Pex20 de Yarrowia (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes);
1354-474	Plásmido Co1E1 origen de replicación
2284-1424	Gen resistente a la ampicilina (AmpR) para selección en E. coli
3183-4487	Secuencia de replicación autónoma de Yarrowia (ARS18; Nº A17608 de acceso al Banco de Genes)
6020-4533	Gen Ura3 de Yarrowia (Nº AJ306421 de acceso al Banco de Genes)

Generación de constructo pZuFmG9G8fu-B, que comprende una fusión génica EgD9ES un/EgD8M

Un sitio BamHI (es decir, GGATCC) se introdujo en pZUFmG9G8fu para generar pZUFmG9G8fu-B (ID de SEC Nº: 442) utilizando los oligonucleótidos y YL1043 e YL1044 (ID de SEC Nº: 443 y 444, respectivamente) como cebadores y pZuFmG9G8fu como molde. El sitio BamHI está situado justo después del codón de iniciación de la traducción ATG y estaba en el marco de lectura de EgD8M, que dio como resultado una inserción de dos aminoácidos (es decir, glicina y serina) entre el resto de aminoácido metionina y la porción restante del polipéptido EgD8M. Esta modificación hizo que la región enlazadora entre EgD9ES y EgD8M se transformara en un péptido que tiene la secuencia expuesta como ID de SEC Nº: 445 (es decir, GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS); el nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida de la longitud completa de la fusión génica EgD9ES/EgD8M se expone como ID de SEC Nº: 446 y 447, respectivamente.

Generación de constructo pZUFmG9A8, que comprende una fusión génica EgD9ES/EaD8S

El plásmido pEaD8S (ID de SEC Nº: 448) fue creado cuando el gen EaD8S (ID de SEC Nº: 429) se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes). Entonces, un sitio BamHI se introdujo en pEaD8S utilizando los oligonucleótidos YL1059 e YL1060 (ID de SEC Nº: 449 y 450, respectivamente) como cebadores y pEaD8S como molde, para generar pEaD8S-B (ID de SEC Nº: 451). El sitio BamHI introducido (es decir, GGATCC) está situado justo antes del codón de iniciación de la traducción de EaD8S en pEaD8S-B, y está en el mismo marco de lectura con EaD8S.

El fragmento BamHI/NotI de pEaD8S-B que comprende EaD8S se utilizó para reemplazar el fragmento BamH/NotI de pZUFmG9G8fu-B (ID de SEC Nº: 442) para generar pZUFmG9A8 (ID de SEC Nº: 452; FIG. 55B) (introduciendo de ese modo EaD8S en lugar de EgD8M). La región enlazadora entre EgD9ES y EaD8S era un péptido que tiene la secuencia expuesta en la ID de SEC Nº: 445 (es decir, GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS). Así, el plásmido pZUFmG9A8 contenía la fusión génica EgD9ES/EaD8S, flanqueada por el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica y el terminador Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes). El nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida de la longitud completa de la fusión génica EgD9ES/EaD8S se exponen como ID de SEC Nº: 453 y 454, respectivamente.

Generación de constructo pZUFmA9G8 que comprende una fusión génica EaD9ES/EgD8M

El plásmido pZUFmEaD9ES (ID de SEC Nº: 455) contenía el gen EaD9ES, flanqueado por el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica y un terminador Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes). Un sitio Nar I se introdujo en el plásmido para generar pZUFmEaD9ES-Na (ID de SEC Nº 456) utilizando oligonucleótidos YL1049 e YL1050 (ID de SEC Nº: 457 y 458, respectivamente) como cebadores y pZUFmEaD9ES como molde. El sitio Nar I introducido (es decir, GGCGCC) está situado justo antes del codón de parada de la traducción de EaD9ES, y está en el mismo marco de lectura de EaD9ES.

El fragmento Nco I/Nar I de pZUFmEaD9ES-Na (ID de SEC Nº: 456) que comprende EaD9ES se utilizó para reemplazar el fragmento NcoI/Nar I de pZUFmG9G8fu-B (ID de SEC Nº: 442) para generar pZUFmA9G8 (ID de SEC Nº: 459) (introduciendo así EaD9ES en lugar de EgD9ES). La región enlazadora entre EaD9ES y EgD8M era un péptido que tiene la secuencia expuesta en la ID de SEC Nº: 445 (es decir, GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS) Por lo tanto, el plásmido pZUFmA9G8 contenía la fusión génica EaD9ES/EgD8M, flanqueada por el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica y el terminador Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes). El nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida de la longitud completa de la fusión génica EaD9ES/EgD8M se exponen como ID de SEC Nº: 460 y 461, respectivamente.

Generación de constructo pZUFmA9A8, que comprende una fusión génica EaD9ES/EaD8S

El fragmento BamH I I/Not I de pEaD8S-B (ID de SEC Nº: 451) que comprende EaD8S se utilizó para reemplazar el fragmento BamH I/Not I de pZUFmA9G8 (ID de SEC Nº: 459) para generar pZUFmA9A8 (ID de SEC Nº: 462). (introduciendo de ese modo EaD8S en lugar de EgD8M). La región enlazadora entre EaD9ES y EaD8S era un péptido que tiene la secuencia expuesta en la ID de SEC Nº: 445 (es decir, GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS). Así, el plásmido pZUFmA9A8 contenía la fusión génica EaD9ES/EaD8S, flanqueada por el promotor FBAINm Yarrowia lipolytica y un terminador un Pex20 (Nº de acceso al Banco de Genes AF054613). El nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida de la longitud completa de la fusión génica EaD9ES/EaD8S se exponen como ID de SEC Nº: 463 y 464, respectivamente.

Generación de constructo pZUFmR9G8, que comprende una fusión génica E389DgeS/EgD8M

El plásmido pE389S (ID de SEC Nº: 465) fue creado cuando el gen E389D9eS (ID de SEC Nº: 358) se clonó en pUC57 (Nº Y14837 de acceso al Banco de Genes). Entonces, un sitio NarI se introdujo en pE389S para generar pE389S-Na (ID de SEC Nº: 466) utilizando los oligonucleótidos YL1051 e YL1052 (ID de SEC Nº: 467 y 468, respectivamente) como cebadores y pE389S como molde. El sitio Nar I introducido (es decir, GGCGCC) está situado justo antes del codón de parada de la traducción y estaba en el mismo marco de lectura de E389D9eS.

El fragmento NcoI/NarI de pE389S-Na que comprenden E389D9eS se utilizó para reemplazar el fragmento NcoI/NarI de pZUFmG9G8fu-B que comprende EgD9ES para generar pZUFmR9G8 (ID de SEC Nº: 469) (introduciendo de ese modo E389D9eS en lugar de EgD9ES). La región enlazadora entre E389D9eS y EgD8M era un péptido que tiene la secuencia expuesta en la ID de SEC Nº: 445 (es decir, GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS). Así, el plásmido pZUFmR9G8 contenía la fusión génica E389D9eS/EgD8M, flanqueada por el promotor FBAINm de Yarrowia lipolytica y un terminador Pex20 (Nº AF054613 de acceso al Banco de Genes). El nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida de la longitud completa de la fusión génica E389D9eS/EgD8M se expone como ID de SEC Nº: 470 y 471, respectivamente.

Ejemplo 56

Análisis funcional de fusiones génicas delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa en la cepa Y2224 de Yarrowia lipolytica

Los plásmidos a partir del Ejemplo 55 [es decir, pZUFmEgD9ES (ID de SEC Nº: 431), pZUFMEgD9ES-Na (ID de SEC Nº: 432), pZUFMG9G8fu (ID de SEC Nº: 439), pZUFmG9G8fu-B (ID de SEC Nº: 442), pZUFmG9A8 (ID de

SEC Nº: 452), pZUFmA9G8 (ID de SEC Nº: 459), pZuFmA9A8 (ID de SEC Nº: 462) y pZUFmR9G8 (ID de SEC Nº: 469)] se transformaron en cepa Y2224 de Yarrowia lipolytica individualmente, como se describe en los Procedimientos Generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después 2 días de cultivo a 30ºC, ocho transformantes de cada reacción de transformación se rayaron sobre nuevas placas de MM y se incubaron durante 2 días 30ºC. Una vez desarrolladas, estas cepas se inocularon individualmente en 3 ml de MM líquido a 30ºC y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron por centrifugación, el sobrenadante se eliminó y se añadieron 3 ml de HGM. Estas cepas se cultivaron en una incubadora a 30ºC agitando a 250 rpm durante 5 días más. Las células se recogieron por centrifugación, se extrajeron los lípidos, y se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos por trans-esterificación, y posteriormente se analizaron con un CG Hewlett-Packard 6890.

Los análisis de CG mostraron que había tanto actividades de delta-9 elongasa como de delta-8 desaturasa en todas las cepas que tienen una fusión génica delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa. Los resultados se compendian a continuación en la Tabla 34. La actividad de delta-9 elongasa se calculó dividiendo la suma del porcentaje en peso (% en peso) para EDA y DGLA entre la suma de los % en peso para LA, EDA y DGLA multiplicando por 100 para expresarlo como un porcentaje; de forma similar, la actividad de delta-8 desaturasa se calculó dividiendo el % en peso de DGLA entre la suma de los % en peso para EDA y DGLA y multiplicando por 100 para expresarlo como un porcentaje.

Tabla 34

Transformante Y2224 (plásmido nucleótido ID de SEC Nº)	Delta-9 elongasa (aminoácido ID de SEC Nº)	[Delta-8 desaturasa (aminoácido ID de SEC Nº)	Enlazador (aminoácido ID de SEC Nº)	Actividad delta-9 elongasa	Actividad delta-8 desaturasa
pZUFmEgD9ES (ID de SEC Nº: 431)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	--	--	20%	--
pZUFmEgD9ES-Na (ID de SEC Nº: 432)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	--	--	19%	--
pZUFmG9G8fu (ID de SEC Nº: 439)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	EgD8M (ID de SEC Nº: 328)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVM (ID de SEC Nº: 438)	17%	73%
pZUFmG9G8fu-B (ID de SEC Nº: 442)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445)	21%	73%
pZUFmG9A8 (ID de SEC Nº: 452)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	EgD8S (ID de SEC Nº: 430)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445)	21%	67%
pZuFmA9G8 (ID de SEC Nº: 459)	EgD9ES (ID de SEC Nº: 319)	EgD8S (ID de SEC Nº: 430)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445)	15%	54%
pZUFmA9A8 (ID de SEC Nº: 462)	EaD9ES (ID de SEC Nº: 422)	EgD8S (ID de SEC Nº: 430)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445)	18%	58%
pZUFmR9G8 (ID de SEC Nº: 469)	E389D9eS (ID de SEC Nº: 359)	EgD8M (ID de SEC Nº: 328)	GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445)	18%	70%

ES 2 559 312 T3

Actividades de delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa en Yarrowia transformada con varias fusiones génicas

Como compendio de la Tabla 34, los datos mostraron que todos los seis genes de la fusión tenían ambas actividades de delta-9 elongasa y de delta-8 desaturasa; así, las proteínas de fusión de los genes de fusión permitían eficazmente la expresión de dos actividades enzimáticas independientes y separables. Más Importante, la fusión entre sí de las dos enzimas independientes como una proteína de fusión separada por una región enlazadora aumentaba el flujo desde LA a DGLA. En todos los casos, el gen de fusión tenía mayor actividad que al menos uno de los genes individuales cuando se expresaba en solitario en Yarrowia. Estos datos sugerían que el producto de la delta-9 elongasa podía ser canalizado directamente como sustrato de la delta-8 desaturasa en la proteína de fusión.

Más específicamente, en el caso de la fusión génica EgD9ES/EgD8M (es decir, pZuFmG9G8fu-B) y la fusión génica EgD9ES/EaD8S (es decir, pZuFmG9A8), la EgD9ES delta-9 elongasa (transformación 21%) se realizó de una forma comparable a la de cuando EgD9ES se expresaba en solitario (20% de transformación [datos pZuFmEgD9ES y Ejemplo 55]). En contraste, sin embargo, la actividad de EgD8M delta-8 desaturasa en Yarrowia expresando pZuFmG9G8-B era aproximadamente un 97% más eficiente que cuando EgD8M se expresaba en solitario (transformación de 73% frente a 37% [Ejemplo 55]). De forma similar, la actividad delta-8 desaturasa EaD8S en Yarrowia expresando pZuFmG9A8 era aproximadamente un 63% más eficiente que cuando EaD8S se expresaba en solitario (transformación de 67% frente a 41% [Ejemplo 55]).

En el caso de la fusión génica EaD9ES/EgD8M (es decir, pZuFmA9G8) y la fusión génica EaD9ES/EaD8S (es decir, pZuFmA9A8), la actividad de EaD9ES delta-9 elongasa era aproximadamente un 15% y un 38% más eficiente, respectivamente, que cuando EaD9ES se expresaba en solitario (transformación de 15% a 18%, respectivamente, frente al 13% de transformación [Ejemplo 55]). Del mismo modo, la actividad de EgD8M delta-8 desaturasa en Yarrowia expresando pZuFmA9G8 era aproximadamente un 46% más eficiente que cuando EgD8M se expresaba en solitario (transformación de 54% frente a 37% [Ejemplo 55]). De igual forma, la actividad de lta-8 desaturasa EaD8S en Yarrowia expresando pZuFmA9A8 era aproximadamente un 32% más eficiente que cuando EaD8S se expresaba en solitario (transformación de 58% frente a 41% [Ejemplo 55]).

Finalmente, en el caso de la fusión génica E389D9eS/EgD8M (es decir, pZuFmR9G8), la actividad de E389D9eS delta-9 elongasa era aproximadamente un 50% más eficiente que cuando E389D9eS se expresaba en solitario (transformación de 18% frente a 12% [Ejemplo 55]). De igual forma, la actividad EgD8M delta-8 desaturasa en Yarrowia expresando pZuFmR9G8 era aproximadamente un 89% más eficiente que cuando EgD8M se expresaba en solitario (transformación de 70% frente a 37% [Ejemplo 55]).

La Tabla 34 también demostró que se prefería el enlazador modificado GAGPARPAGLPPATYYDSLAVMGS (ID de SEC Nº: 445) en comparación con el enlazador expuesto como ID de SEC Nº: 438 en Yarrowia lipolytica, cuando se fusionan los genes delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa juntos.

Será evidente para el experto en la técnica que otros genes desaturasa y elongasa PUFA que son preferidos para expresión en Yarrowia lipolytica (incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los genes descritos en las Tablas 8-19) pueden ser fusionados juntos de una forma similar a la descrita anteriormente y ser expresados en Yarrowia lipolytica. Los promotores y terminadores preferidos adecuados para la construcción de un casete de expresión (en donde el ORF expresado codifica una multienzima) pueden ser seleccionados de los descritos en las Tablas 8-19. Se plantea la hipótesis de que un aumento de la eficiencia o del flujo se observarían en el gen de fusión en oposición a cuando cualquiera (o ambos) de los genes individuales se expresan en solitario.

Ejemplo 57

Creación de fusiones génicas delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa para expresión en soja

Con el fin de caracterizar fusiones multienzima entre delta-9 elongasas y delta-8 desaturasas en soja, se crearon una serie de delta-9 elongasa/delta-8 multienzimas. Los dominios delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa estaban separados por el enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 198). Para la comparación, se crearon también constructos que co-expresaban genes individuales delta-9 elongasa y delta-8 desaturasa. Delta-9 elongasas utilizadas incluyen EgD9elo (Ejemplo 16; ID de SEC Nº: 112; también denominados como EgD9e y EgD9E en el presente documento, pero son idénticos) y EaD9elo1 (ID de SEC Nº: 252; Ejemplo 36; también denominado como EaD9E y EaD9e en el presente documento, pero todos son idénticos). Delta-8 desaturasas utilizadas incluyen TpomD8 (ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21) y la Euglena anabaena delta-8 desaturasa (EaD8Des3; ID de SEC Nº: 427; también denominada como EaD8 pero son idénticos).

En el presente Ejemplo y para el Ejemplo 23, que describe la síntesis de la fusión EgD9elo-EgDHAsyn1Link-PavD8, se añadieron nucleótidos adicionales al extremo 3' de la secuencia del enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 para permitir la clonación al realizar las fusiones para todos los constructos. Así, 4 aminoácidos adicionales fueron incluidos entre el extremo del enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 198; PARPAGLPPATYYDSLAV) y el inicio de la delta- 8 desaturasa utilizado (es decir, ID de SEC Nº: 472; PARPAGLPPATYYDSLAVSGRT).

El plásmido pKR1183 (ID de SEC Nº: 266) que comprende la fusión de Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (Híbrido1-HGLA sintasa; también denominada EaD9e/TpomD8) fue descrito en el Ejemplo 38.

Otros plásmidos descritos en el presente Ejemplo incluyen: pKR1014 (descrito en la publicación de patente de EE.UU. Nº US 2008/0095915 (presentada el 22 de octubre de 2007; Expediente Fiscal Nº BB-1574; que comprende EgD9e y TpomD8 expresados de forma individual), pKR1152 (que comprende un EgD9e y EaD8 expresados de forma individual), pKR1151 (que comprende un EaD9e y TpomD8 expresados de forma individual), pKR1150 (que comprende un EaD9e y EaD8 expresados de forma individual), pKR1184 (que comprende una fusión génica EaD9e/EaD8), pKR1199 (que comprende una fusión génica EgD9e/TpomD8) y pKR1200 (que comprende una fusión génica EgD9e/EaD8). Un compendio de los constructos elaborados y de los respectivos genes ensayados junto con las ID de SEC Nº para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos producidos se muestra en la Tabla 35.

El análisis funcional de la actividad de cada fusión génica se ensaya infra, en el Ejemplo 60.

Tabla 35

Desaturasas y elongasas preferidas para la creación de fusiones génicas Delta-9/Delta-8 en soja				
Vector	Vector ID de SEC Nº	Gen (o genes) expresados	ID de SEC Nº para secuencia (o secuencias) de nucleótidos	ID de SEC Nº para secuencias de aminoácidos
pKR1014	ID de SEC Nº: 474	EgD9e TpomD8	ID de SEC Nº: 112 ID de SEC Nº: 162	ID de SEC Nº: 513 ID de SEC Nº: 514
pKR1152	ID de SEC Nº: 479	EgD9e EaD8	ID de SEC Nº: 112 ID de SEC Nº: 427	ID de SEC Nº: 513 ID de SEC Nº: 428
pKR1151	ID de SEC Nº: 484	EaD9e TpomD8	ID de SEC Nº: 252 ID de SEC Nº: 162	ID de SEC Nº: 254 ID de SEC Nº: 514
pKR1150	ID de SEC Nº: 485	EaD9e EaD8	ID de SEC Nº: 252 ID de SEC Nº: 427	ID de SEC Nº: 254 ID de SEC Nº: 428
pKR1199	ID de SEC Nº: 488	fusión EgD9e/TpomD8	ID de SEC Nº: 492	ID de SEC Nº: 515
pKR1200	ID de SEC Nº: 490	fusión EgD9e/EaD8	ID de SEC Nº: 493	ID de SEC Nº: 516
pKR1183	ID de SEC Nº: 266	fusión EaD9e/TpomD8	ID de SEC Nº: 494	ID de SEC Nº: 517
pKR1184	ID de SEC Nº: 491	fusión EaD9e/EaD8	ID de SEC Nº: 495	ID de SEC Nº: 518
KS373	ID de SEC Nº: 179	fusión EgD9e/PavD8	ID de SEC Nº: 496	ID de SEC Nº: 519

Construcción de pKR1014

Vector pKR123r, que fue descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2004/071467 (publicado el 26 de agosto de 2004), contiene un sitio NotI flanqueado por el promotor inhibidor de tripsina de soja Kunitz (KTi3) (Jofuku et al., Plant Cell 1:1079-1093 (1989)) y región de terminación KTi3', cuyo aislamiento se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.372.965 (casete KTi3/NotI/KTi3'). TpomD8 (ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21) se liberó a partir de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165; Ejemplo 21) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI de pKR123r para producir pKR1007 (ID de SEC Nº: 473).

El vector pKR912, que se describió anteriormente en el documento US-2007-0118929-A1 y publicado el 24 de mayo de 2007, contiene el gen higromicina B fosfotransferasa, flanqueado por el promotor 35S (Odell et al., Nature 313: 810-812 (1985)) y terminador de la transcripción NOS 3' (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1:561-570 (1982)) (casete 35S/HPT/NOS3') para la selección en plantas tal como soja. El vector pKR912 contiene también EgD9e (ID de SEC Nº: 112), flanqueado por el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina (Beachy et al., EMBO J. 4: 3047-3053 (1985)) y la región 3' de terminación de la transcripción del gen de la faseolina (Doyle et al., J. Biol. Chem. 261:9228-9238 (1986)), permitiendo así fuerte expresión específica de tejido de EgD9e en las semillas de soja.

El plásmido pKR1007 (ID de SEC Nº: 473) fue digerido con PstI, y el fragmento que contiene Tetruetreptia pomquetensis delta-8 desaturasa se clonó en el sitio SbfI de pKR912, para dar pKR1014 (ID de SEC Nº: 474). De esta forma, la Tetruetreptia pomquetensis delta-8 desaturasa es co-expresada con Euglena gracilis delta-9 elongasa detrás de promotores fuertes, específicos de la semilla. Una representación esquemática de pKR1014 se muestra en la FIG. 56. En la FIG. 56, TpomD8 se denomina Tetruetreptia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa, y EgD9e se denomina eug el1.

Construcción de pKR1151

Con el fin de introducir sitios de restricción NotI y NcoI en el extremo 5' de las secuencias de codificación y un sitio NotI en el extremo 3' de las secuencias codificantes, EaD8 (ID de SEC Nº: 427) se amplificó con los cebadores oligonucleótidos EaD8-5 (ID de SEC Nº: 475) y EaD8-3 (ID de SEC Nº: 476) utilizando el ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pLF120-3 (ID de SEC Nº: 477).

El vector pLF120-3 (ID de SEC Nº: 477) fue digerido con NotI y el fragmento que contiene EaD8 se clonó en el sitio NotI de pKR457 (ID de SEC Nº: 122; Ejemplo 16), para producir pKR1138 (ID de SEC Nº: 478).

El vector pKR1138 (ID de SEC Nº: 478) fue digerido con BsiWI y el fragmento que contiene EaD8 se clonó en el sitio BsiWI de pKR912 para dar pKR1152 (ID de SEC Nº: 479). Una representación esquemática de pKR1152 se muestra en la FIG. 57. En la FIG. 57, EaD8 se denomina EaD8Des3 y EgD9e se denomina eug el1

Construcción de pKR1152

Con el fin de introducir sitios de restricción NotI y NcoI en el extremo 5' de Las secuencias codificantes y un sitio NotI en el extremo 3' de las secuencias codificantes, EaD9e era amplificado por PCR a partir de pLF121-1 (ID de SEC Nº: 250; Ejemplo 36) con cebadores oligonucleótidos oEAd9el1-1 (ID de SEC Nº: 298; Ejemplo 44) y oEAd9el1-2 (ID de SEC Nº: 480) utilizando ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. Los fragmentos de ADN resultantes se clonaron en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, pKR1137 para producir (ID de SEC Nº: 481).

EaD9e fue liberado a partir de pKR1137 (ID de SEC Nº: 481) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI de pKR72 (ID de SEC Nº: 105; Ejemplo 15) para producir pKR1140 (ID de SEC Nº: 482).

TpomD8 fue liberado a partir de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165; Ejemplo 21) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR457 (ID de SEC Nº: 122; Ejemplo 16) para producir pKR1145 (ID de SEC Nº: 483).

El vector pKR1145 (ID de SEC Nº: 483) fue digerido con BsiWI y el fragmento que contiene TpomD8 se clonó en el sitio BsiWI de pKR1140 (ID de SEC Nº: 482) para dar pKR1151 (ID de SEC Nº: 484). Una representación esquemática de pKR1151 se muestra en la FIG. 58. En la FIG. 58, TpomD8 se denomina Tetruetreptia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa y EaD9e se denomina EAd9elong.

Construcción de vector pKR1150

El vector pKR1138 (ID de SEC Nº: 478) fue digerido con BsiWI, y el fragmento que contiene EaD8 se clonó en el sitio BsiWI de pKR1140 (ID de SEC Nº: 482) para dar pKR1150 (ID de SEC Nº: 485). Una representación esquemática de pKR1150 se muestra en la FIG. 59. En la FIG. 59, EaD8 se denomina EaD8Des3 y EaD9e se denomina EAd9elong.

Construcción de pKR1199

El fragmento de ADN NcoI/NotI de KS373 (ID de SEC Nº: 179; Ejemplo 23), que contiene EgD9elo-EgDHAsyn1Link, se clonó en el fragmento de ADN NcoI/NotI de pKR1177 (ID de SEC Nº: 264; Ejemplo 38), que contiene el promotor para la subunidad α' de β-conglicinina, para producir pKR1190 (ID de SEC Nº: 486).

El fragmento NotI de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165; Ejemplo 21), que contiene TpomD8, se clonó en el fragmento NotI de pKR1190 (ID de SEC Nº: 486) para producir pKR1195 (ID de SEC Nº: 487).

El fragmento de ADN BamHI de pKR1195 (ID de SEC Nº: 487), que contiene el fusión génica EgD9e/TpomD8, se clonó en el fragmento de ADN BamHI de pKR325, descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2006/012325 para producir pKR1199 (ID de SEC Nº: 488). Una representación esquemática de pKR1199 se muestra en la FIG. 60. En la FIG. 60, EgD9e/TpomD8 se denomina EGd9elong-TPOMd8DS.

Construcción de pKR1200

El fragmento NotI de pLF120-3 (ID de SEC Nº: 477), que contiene EaD8 se clonó en el fragmento NotI de pKR1190 (ID de SEC Nº: 486) para producir pKR1196 (ID de SEC Nº: 489).

El fragmento de ADN BamHI de pKR1196 (ID de SEC Nº: 489), que contiene el gen de fusión EgD9e/EaD8, se clonó en el fragmento de ADN BamHI de pKR325, descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2006/012325 para producir pKR1200 (ID de SEC Nº: 490). Una representación esquemática de pKR1200 se muestra en la FIG. 61. En la FIG. 61, EgD9e/EaD8 se denomina EGd9ELONG-EAd8DS.

Construcción de pKR1184

El fragmento NotI de pLF120-3 (ID de SEC Nº: 477), que contiene EaD8, se clonó en el fragmento NotI de pKR1179 (ID de SEC Nº: 265) para producir pKR1184 (ID de SEC Nº: 491). Una representación esquemática de pKR1184 se muestra en la FIG. 62. En la FIG. 62, EaD9e/EaD8 se denomina EAd9ELONG-EAd8DS.

Ejemplo 58

Construcción de vector de expresión pKR1321 de soja para la expresión de una fusión génica Tetruetreptia CCMP1491 pomquetensis delta-8 desaturasa-Euglena anabaena delta-9 elongasa (fusión TpomD8-EaD9Elo1)

El presente ejemplo describe la construcción de un gen de fusión en marco entre la Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8; ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21) y la Euglena anabaena delta-9 elongasa (EaD9e; ID de SEC Nº: 252, Ejemplo 36). Cada Dominio está separado por el enlazador EgDHAsyn1 con 4 aminoácidos adicionales incluidos entre el extremo del enlazador rico en prolina EgDHAsyn1 y el inicio de la EaD9e, como se describe en el Ejemplo 57 (es decir, ID de SEC Nº: 472; PARPAGLPPATYYDSLAV**SGRT**).

El plásmido pKR1301 (ID de SEC Nº: 307; Ejemplo 44) fue digerido con EcoRI y el fragmento de ADN que contiene el extremo 3' de TpomD8-EgDHAsyn1Link (denominado TpomDB+L1TR1) se volvió a ligar para formar pKR1303 (ID de SEC Nº: 497).

El fragmento NotI de pKR1137 (ID de SEC Nº: 481; Ejemplo 57), que contiene el EaD9e, se clonó en el sitio EagI de pKR1303 (ID de SEC Nº: 497) para producir pKR1308 (ID de SEC Nº: 498). De este forma, EaD9e se fusionó con el extremo 3' de TpomD8.

El casete Gy1/Pavelo/legA2 fue liberado del plásmido pKR336 (descrito en la publicación PCT Nº WO 04/071467) mediante digestión con PstI/BamHI y se clonaron en el sitio PstI/BamHI de pKR268 (descrito en la publicación PCT Nº WO 04/071467) para producir pKR393 (ID de SEC Nº: 499). El gen Pavelo fue liberado de pKR393 (ID de SEC Nº: 499) por digestión con NotI, y el vector se volvió a ligar para formar pKR407 (ID de SEC Nº: 500).

TpomD8 fue liberado de pLF114-10 (ID de SEC Nº: 165; Ejemplo 21) por digestión con NotI y se clonó en el sitio NotI del plásmido pKR407 (ID de SEC Nº: 500) para producir pKR1018 (ID de SEC Nº: 501).

El plásmido pKR1018 (ID de SEC Nº: 501) fue digerido con HindIII/Ncori, y el fragmento que contiene el extremo 5' de la Tpomd8 se clonó en el sitio HindIII/EcoRI de pKR1308 (ID de SEC Nº: 498) para producir pKR1312 (ID de SEC Nº: 502). De esta forma, la secuencia TpomD8 fue restaurada, y se formó la fusión TpomD8/EaD9e.

El fragmento NotI de pKR1312 (ID de SEC Nº: 502), que contiene la fusión TpomD8/EaD9e, se clonó en el sitio NotI de pKR72 (ID de SEC Nº: 105; Ejemplo 23) para producir pKR1321 (ID de SEC Nº: 503). Una representación esquemática de pKR1321 se muestra en la FIG. 63. En la FIG. 63, TpomD8/EaD9e se denomina fusión TPd8ds-EAd9el.

Ejemplo 59

Construcción de vector de expresión pKR1326 de soja para expresión de la fusión génica Euglena anabaena delta-9 elongasa-Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa utilizando enlazador rico en prolina Euglena anabaena DHAsyn1

El presente Ejemplo describe la construcción de un gen de fusión en marco entre la Euglena anabaena delta-9 elongasa (EaD9e; ID de SEC Nº: 252, Ejemplo 36) y la Tetruetreptia pomquetensis CCMP1491 delta-8 desaturasa (TpomD8; ID de SEC Nº: 162; Ejemplo 21). Cada Dominio está separado por el enlazador rico en prolina EaDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 235), pero con 3 aminoácidos adicionales incluidos entre el extremo del enlazador rico en prolina EaDHAsyn1 (EaDHAsyn1Link) y el inicio de la EaD9e (es decir, ID de SEC Nº: 504; PGGPGKPSEIASLPPPIRPVGNPPAAYYDALAT**GRT**) La clonación se realizó de forma similar a la descrita en el Ejemplo 57.

Una fusión inicial en marco entre la EaD9e y la EaDHAsyn1Link (EaD9elo-EgDHAsyn1Link) se realizó mediante amplificación por PCR y estaba flanqueada por un NotI y un sitio NcoI en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3'. EaD9e (ID de SEC Nº: 252) se amplificó a partir de pLF121-1 (ID de SEC Nº: 250) con oligonucleótidos oEAd9el1-1 (ID de SEC Nº: 298) y EaLink1 (ID de SEC Nº: 505), utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Nº F553S de Cat., Finnzymes Oy, Finlandia) según el protocolo del fabricante. La EaDHAsyn1Link (ID de SEC Nº: 234) se amplificó de una forma similar a partir de pLF117-1 (ID de SEC Nº: 87; Ejemplo 13) con oligonucleótidos EaLink2 (ID de SEC Nº: 506) y EaLink3 (ID de SEC Nº: 507). Los dos productos de PCR resultantes se combinaron y se volvieron a amplificar utilizando oEAd9el1-1 (ID de SEC Nº: 298) y EaLink3 (ID de SEC Nº: 507)

para formar EaD9e-EaDHAsyn1Link. La secuencia de la EaD9e-EaDHAsyn1Link se muestra en la ID de SEC Nº: 508. La EaD9e-EaDHAsyn1Link se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación Zero Blunt® PCR (Invitrogen Corporation), según el protocolo del fabricante, para producir pKR1305 (ID de SEC Nº: 509).

El fragmento de ADN EagI de pKR1305 (ID de SEC Nº: 509), que contiene EaD9e-EaDHAsyn1Link, se clonó en el sitio NotI de pKR1304 (ID de SEC Nº: 310; Ejemplo 44) para producir pKR1317 (ID de SEC Nº: 510). De esta forma, el extremo 5' de la TpomD8 se fusionó con EaD9e-EaDHAsyn1Link.

El fragmento EcoRI/Asp718 de pKR1127 (ID de SEC Nº: 168; Ejemplo 22), que contiene el extremo 3' de la TpomD8 se clonó en el fragmento EcoRI/Asp718 de pKR1317 (ID de SEC Nº: 510), que contiene EaD9e-EaDHAsyn1Link para producir pKR1320 (ID de SEC Nº: 511).

El fragmento NotI de pKR1320 (ID de SEC Nº: 511), que contiene la fusión, se clonó en el fragmento NotI de pKR72 (ID de SEC Nº: 105; Ejemplo 15) para producir pKR1326 (ID de SEC Nº: 512). Una representación esquemática de pKR1326 se muestra en la FIG. 64. En la FIG. 64, EaD9e/TpomD8 con el enlazador rico en prolina EaDHAsyn1 se denomina EAd9el-TPOMd8ds L2fusion.

Ejemplo 60

Análisis funcionales de fusiones génicas de delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa en soja

El presente Ejemplo describe la transformación y expresión en embriones somáticos de soja de pKR1014 (ID de SEC Nº: 474), pKR1152 (ID de SEC Nº: 479), pKR1151 (ID de SEC Nº: 484), pKR1150 (ID de SEC Nº: 485), pKR1199 (ID de SEC Nº: 488), pKR1200 (ID de SEC Nº: 490) y pKR1184 (ID de SEC Nº: 491), cuyas síntesis se describieron anteriormente en el Ejemplo 57. Los análisis funcionales de pKR1183 (ID de SEC Nº: 266) y KS373 (ID de SEC Nº: 179) fueron descritos anteriormente en los Ejemplos 46 y 31, respectivamente.

El cultivo de suspensión embriogénica Soja (cv. Jack) se transformó con cada uno de los Vectores Anteriores, y los embriones se maduraron en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medios líquidos SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24:393 (2005)), como se describe en el Ejemplo 25 y descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicada el 29 de noviembre de 2007.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, un subconjunto de embriones de soja transformados (es decir, 5-6 embriones por caso) se recogieron y se analizaron como se describe en el presente documento.

De esta forma, se analizaron aproximadamente 30 casos transformados con pKR1014 (ID de SEC Nº: 474), pKR1152 (ID de SEC Nº: 479), pKR1151 (ID de SEC Nº: 484), pKR1150 (ID de SEC Nº: 485), pKR1199 (ID de SEC Nº: 488), pKR1200 (ID de SEC Nº: 490), o pKR1184 (ID de SEC Nº: 491). Los cinco casos que tienen el mayor contenido promedio de DGLA (promedio de los 5 embriones analizados) se muestran en las FIG. 65, 66, 67, 68, 69, 70 o 71, respectivamente. En las FIG. 65-71, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y ETA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales. La Tabla 36 compendia el vector, los genes utilizados, el número de experimento (MSE#) y la FIG. correspondiente.

En las FIG. 65-71, la actividad de elongación se expresa como % de elongación delta-9 de ácidos grasos C18 (% de elong. delta-9 de C18), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto])*100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado para LA y ALA se determina como ([DGLA+ETA+EDA+ERA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA])*100.

En las FIG. 65-71, el porcentaje de desaturación combinado de EDA y ERA se muestra como "% de desat. delta-8 de C20", determinado como: ([DGLA+ETA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA])*100. Esto también se conoce como el % de desaturación global.

Tabla 36

Análisis funcional of fusiones de genes delta-9/delta-8 en soja			
Vector	Gen(o genes) expresados	Experimento MSE	FIG. # que contiene análisis funcional
pKR1014	EgD9e	MSE2024	FIG. 65
	TpomD8		
pKR1152	EgD9e	MSE2136	FIG. 66
	EaD8		
pKR1151	EaD9e	MSE2131	FIG. 67

Análisis funcional of fusiones de genes delta-9/delta-8 en soja			
Vector	Gen(o genes) expresados	Experimento MSE	FIG. # que contiene análisis funcional
	TpomD8		
pKR1150	EaD9e	MSE2130	FIG. 68
	EaD8		
pKR1199	fusión EgD9e/TpomD8	MSE2153	FIG. 69
pKR1200	fusión EgD9e/EaD8	MSE2154	FIG. 70
pKR1183	fusión EaD9e/TpomD8	MSE2145 (Ejemplo 46)*	FIG. 37
pKR1184	fusión EaD9e/EaD8	MSE2146	FIG. 71
KS373	fusión EgD9e/PavD8	MSE2071 (Ejemplo 31)	FIG. 24
* En la FIG. 37, MSE2145 es listado como MSE2144			

Una comparación de delta-9 elongasas con delta-8 desaturasas expresadas de forma individual frente a en la fusión equivalente de delta-9-elongasa/delta-8 desaturasa se muestra en la FIG. 72. En la FIG. 72, cada punto de dato representa el % DGLA y % EDA promedio para 5-6 embriones (como % de ácidos grasos totales) para todos los casos analizados, y el % DGLA promedio se registra frente al % EDA promedio. En la FIG. 72A, EgTpom representa EgD9e co-expresada con TpomD8 (pKR1014), y EgTpomfus representa la fusión EgD9e/TpomD8 (pKR1199). En la FIG. 72B, EgEa representa EgD9e con co-expresada con EaD8 (pKR1152), y EgEafus representa la fusión EgD9e/EaD8 (pKR1200). En la FIG. 72C, EaTpom representa EaD9e co-expresada con TpomD8 (pKR1151), y EaTpomfus representa la fusión EaD9e/TpomD8 (pKR1183). En la FIG. 72D, EaEa representa EaD9e co-expresada con EaD8 (pKR1150), y EaEafus representa la fusión EaD9e/EaD8 (pKR1200).

Ejemplo 61

Análisis funcional de la fusión de genes delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa/delta-5 desaturasa

El presente Ejemplo describe la transformación y expresión en embriones somáticos de soja de pKR1322 (ID de SEC Nº: 314; Ejemplo 50) que comprende una fusión triple EaD9Elo1-TpomD8-EaD5Des1 (también denominado EaD9e/TpomD8/EaD5). Cada dominio está separado por el enlazador EgDHAsyn1 con 4 aminoácidos adicionales (es decir, ID de SEC Nº: 472; PARPAGLPPATYYDSLAVSGRT).

El cultivo de suspensión embriogénica de soja (cv. Jack) se transformó con pKR1322, y los embriones se maduraron en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medios líquido SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24: 393 (2005)) como se describe en el Ejemplo 25 y se ha descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicada el 29 de noviembre de 2007.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, se recolectó y se analizó, como se describe en el presente documento, un subconjunto de embriones de soja transformados (es decir, 5 embriones por caso).

De esta manera, se analizaron aproximadamente 30 casos transformados con pKR1322 (Experimento MSE2274), y los cinco casos que tienen el contenido medio más alto de ARA y EPA (media de los cinco embriones analizados) se muestran en la FIG. 73. En la FIG. 73, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), 18:2 (5,9), LA, ALA, EDA, ERA, SCI, DGLA, JUN (también denominado JUP), ETA, ARA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un Porcentaje en peso (% en peso) de los ácidos grasos totales.

En la FIG. 73, la actividad de elongación se expresa como % delta-9 de elongación de ácidos grasos C18 (% Elo), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto])*100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado para LA y ALA se determina como: ([DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA])*100.

En la FIG. 73, el porcentaje combinado de delta-8 desaturación para EDA y ERA se muestra como "% D8", determinado como: ([DGLA+ETA+EPA+ARA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA+EPA+ARA])*100. Esto también es referido como % delta-8 de desaturación global.

En la FIG. 73, el porcentaje combinado delta-5 de desaturación para DGLA y ETA se muestra como "% D5", determinado como: ([EPA+ARA]/[DGLA+ETA+EPA+ARA])*100. Esto también es referido como el % delta-5 de desaturación global.

Como resumen de la FIG. 73, los tres dominios son funcionales. Esta fusión podría ser referida bien como sintasa de EPA o bien como sintasa de ARA.

Ejemplo 62

Análisis funcional de fusiones de los genes delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa y delta-8 desaturasa/delta-9 elongasa

El presente Ejemplo describe la transformación y expresión en embriones somáticos de soja de cualquier pKR1326 (ID de SEC Nº: 512), que comprende una fusión EaD9Elo1-TpomD8 (también denominada EaD9e/TpomD8) separados por el enlazador EaDHAsyn1 con 3 aminoácidos adicionales (es decir, ID de SEC Nº: 504; PGGPGKPSEIASLPPPIRPVGNPPAAYYDALAT**GRT**), o pKR1321 (ID de SEC Nº: 503; Ejemplo 58), que comprende la fusión TpomD8/EaD9e separados por el enlazador EgDHAsyn1.

El cultivo de suspensión embriogénica de Soja (cv. Jack) se transformó con pKR1326 o pKR1321, y los embriones se maduraron en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medio líquidos SHaM; Schmidt et al., Cell Biology and Morphogenesis, 24:393 (2005)), como se describe en el Ejemplo 25 y se ha descrito previamente en la publicación PCT Nº WO 2007/136877, publicada el 29 de noviembre de 2007.

Después de la maduración en medios líquidos SHaM, se recogió y se analizó como se describen en el presente documento un subconjunto de embriones de soja transformado (es decir, 5 embriones por caso).

De esta manera, se analizaron aproximadamente 30 casos transformados con pKR1326 (Experimento MSE2275), y los cinco casos que tienen el contenido medio más alto de DGLA y ETA (media de los 5 embriones analizados) se muestran en la FIG. 74. En la FIG. 74, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA y DGLA, y ETA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como un porcentaje en peso (% en peso) de ácidos grasos totales.

En la FIG. 74, la actividad de elongación se expresa como % delta-9 de elongación de ácidos grasos C18 (% delta-9 de Elong. C18), calculado según la siguiente fórmula: ([producto]/[sustrato+producto])* 100. Más específicamente, el porcentaje de elongación combinado para LA y ALA se determina como: ([DGLA+ETA+EDA+ERA]/[LA+ALA+DGLA+ETA+EDA+ERA])*100.

En la FIG. 74, el porcentaje combinado de desaturación para EDA y ERA se muestra como "% delta-8 de desat. C20", determinado como: ([DGLA+ETA]/[DGLA+ETA+EDA+ERA])*100. Esto también es referido como el % de desaturación global.

Como resumen de la FIG. 74, el enlazador EaDHAsyn1 funciona de manera similar al enlazador EgDHAsyn1. No se detectó actividad en ninguno de los casos transformados con pKR1321 donde TpomD8 se fusionaba con EaD9e con el enlazador EgDHAsyn1.

REIVINDICACIONES

1. Una multienzima que comprende un único polipéptido que tiene al menos dos actividades enzimáticas independientes y separables, en donde dichas actividades enzimáticas comprenden al menos un ácido graso elongasa enlazado a al menos un ácido graso desaturasa, en donde dicha elongasa está enlazada a dicha desaturasa y dicho enlace se selecciona del grupo constituido por una ID de SEC Nº: 198, ID de SEC Nº: 200, ID de SEC Nº: 235, ID de SEC Nº: 438, ID de SEC Nº: 472, ID de SEC Nº: 445, y ID de SEC Nº: 504.

2. La multienzima de la reivindicación 1, en donde la elongasa de ácido graso es una elongasa $C_{20/22}$ y la desaturasa de ácido graso es una delta-4 desaturasa.

3. La multienzima de la reivindicación 1, en donde la elongasa de ácido graso es una delta-9 elongasa y la desaturasa de ácido graso es una delta-8 desaturasa.

4. Un polinucleótido aislado que codifica una multienzima según la reivindicación 1, en donde el polinucleótido comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DHA, en donde el polipéptido tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, basado en el procedimiento Clustal V del alineamiento, en comparación con una secuencia de aminoácidos como se expone en ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96, o ID de SEC Nº: 97;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DHA en donde la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, basada en el procedimiento BLASTN del alineamiento, en comparación con una secuencia de nucleótidos como se expone en ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 205, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, o ID de SEC Nº: 410;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DHA, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 205, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, o ID de SEC Nº: 410; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b), o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del mismo número de nucleótidos y son 100% complementarias.

5. El polinucleótido aislado de la reivindicación 4, en donde dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en ID de SEC Nº: 12, ID de SEC Nº: 22, ID de SEC Nº: 95, ID de SEC Nº: 96 o ID de SEC ID de SEC Nº: 97.

6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en ID de SEC Nº: 11, ID de SEC Nº: 21, ID de SEC Nº: 91, ID de SEC Nº: 92, ID de SEC Nº: 93, ID de SEC Nº: 205 o la ID de SEC Nº: 410.

7. Un polinucleótido aislado que codifica una multienzima según la reivindicación 1, en donde el polinucleótido comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA, en donde el polipéptido se expone en la ID de SEC Nº: 441, ID de SEC Nº: 447, ID de SEC Nº: 454, ID de SEC Nº: 461, ID de SEC Nº: 464, ID de SEC Nº: 471, ID de SEC Nº: 515, ID de SEC Nº: 516, ID de SEC Nº: 517, ID de SEC Nº: 518, o ID de SEC Nº: 519;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA en donde la secuencia de nucleótidos se expone en la ID de SEC Nº: 440, ID de SEC Nº: 446, ID de SEC Nº: 453, ID de SEC Nº: 460, ID de SEC Nº: 463, ID de SEC Nº: 470, ID de SEC Nº: 492, ID de SEC Nº: 493, ID de SEC Nº: 494, ID de SEC Nº: 495, o ID de SEC Nº: 496;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de sintasa de DGLA, en donde la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos como se expone en ID de SEC Nº: 440, ID de SEC Nº: 446, ID de SEC Nº: 453, ID de SEC Nº: 460, ID de SEC Nº: 463, ID de SEC Nº: 470, ID de SEC Nº: 492, ID de SEC Nº: 493, ID de SEC Nº: 494, ID de SEC Nº: 495, o ID de SEC Nº: 496; o

(d) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c), en donde el complemento y la secuencia de nucleótidos constan del mismo número de nucleótidos y son 100% complementarias.

8. Un constructo recombinante que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados de las reivindicaciones 4 a 7 enlazados de forma operable con al menos una secuencia reguladora.

9. Una célula anfitriona que comprende en su genoma el constructo recombinante de la reivindicación 8.

10. La célula anfitriona de la reivindicación 9, en donde la célula anfitriona es una célula vegetal.

11. La célula anfitriona de la reivindicación 10, en donde la célula vegetal es una célula vegetal de semilla oleaginosa.

12. La célula anfitriona de la reivindicación 9, en donde la célula anfitriona es una célula de levadura.

13. La célula anfitriona de la reivindicación 12, en donde la célula de levadura es una célula de levadura oleaginosa.

14. La célula anfitriona de la reivindicación 13, en donde la célula de levadura oleaginosa es un Yarrowia sp.

15. Un procedimiento para transformar una célula, que comprende transformar una célula con el constructo recombinante de la reivindicación 8 y seleccionar aquellas células transformadas con dicho constructo recombinante.

16. Un procedimiento para producir una planta transformada que comprende transformar una célula vegetal con el constructo recombinante de la reivindicación 8 y regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en donde dicha planta es una planta de soja.

18. Una planta que comprende en su genoma el constructo recombinante de la reivindicación 8.

19. La planta de la reivindicación 18, en donde dicha planta es una planta de semilla oleaginosa.

20. La planta de la reivindicación 19, en donde dicha planta de semilla oleaginosa es soja.

21. Semilla obtenida de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde dicha semilla comprende el constructo recombinante de la reivindicación 8.

22. Un procedimiento para la transformación de ácido linoleico en ácido dihomo gamma-linolénico o ácido α-linolénico en ácido eicosatetraenoico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana que comprende el constructo recombinante de la reivindicación 8 que codifica una sintasa de DGLA y una fuente de ácido linoleico o ácido α-linolénico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en condiciones en las que se produce ácido dihomo gamma-linolénico o ácido dihomo eicosatetraenoico.

23. Un procedimiento para la transformación de ácido eicosapentaenoico en ácido docosahexaenoico que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana que comprende el constructo recombinante de la reivindicación 8 que codifica una sintasa de DHA y una fuente de ácido eicosapentaenoico; y

b) cultivar la célula anfitriona de (a) en condiciones en las que se produce ácido docosahexaenoico.

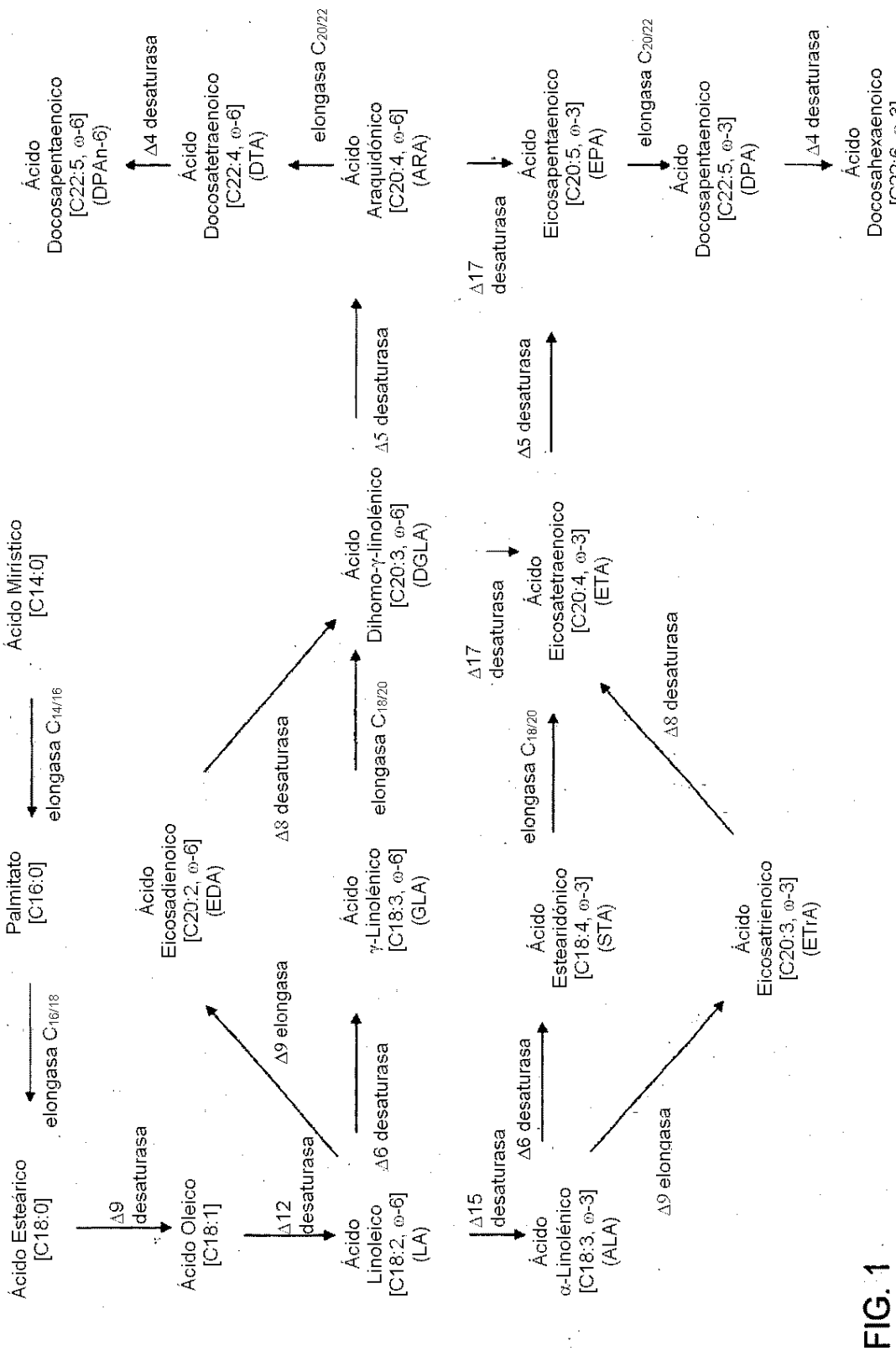

Ácido Esteárico [C18:0]
Δ9 desaturasa
Ácido Oleico [C18:1]
Δ12 desaturasa
Ácido Linoleico [C18:2, ω-6] (LA)
Δ6 desaturasa
Ácido γ-Linolénico [C18:3, ω-6] (GLA)
Δ9 elongasa
Ácido Eicosadienoico [C20:2, ω-6] (EDA)
Δ8 desaturasa
Ácido Dihomo-γ-linolénico [C20:3, ω-6] (DGLA)
Δ5 desaturasa
Ácido Araquidónico [C20:4, ω-6] (ARA)
elongasa C20/22
Ácido Docosatetraenoico [C22:4, ω-6] (DTA)
Δ4 desaturasa
Ácido Docosapentaenoico [C22:5, ω-6] (DPAn-6)
elongasa C16/18
Palmitato [C16:0]
elongasa C14/16
Ácido Mirístico [C14:0]
Δ15 desaturasa
Ácido α-Linolénico [C18:3, ω-3] (ALA)
Δ6 desaturasa
Ácido Estearidónico [C18:4, ω-3] (STA)
Δ9 elongasa
Ácido Eicosatrienoico [C20:3, ω-3] (ETrA)
elongasa C18/20
Ácido Eicosatetraenoico [C20:4, ω-3] (ETA)
Δ8 desaturasa
Ácido Eicosapentaenoico [C20:5, ω-3] (EPA)
Δ17 desaturasa
Δ5 desaturasa
elongasa C20/22
Ácido Docosapentaenoico [C22:5, ω-3] (DPA)
Δ4 desaturasa
Ácido Docosahexaenoico [C22:6, ω-3] (DHA)

FIG. 1

FIG. 2

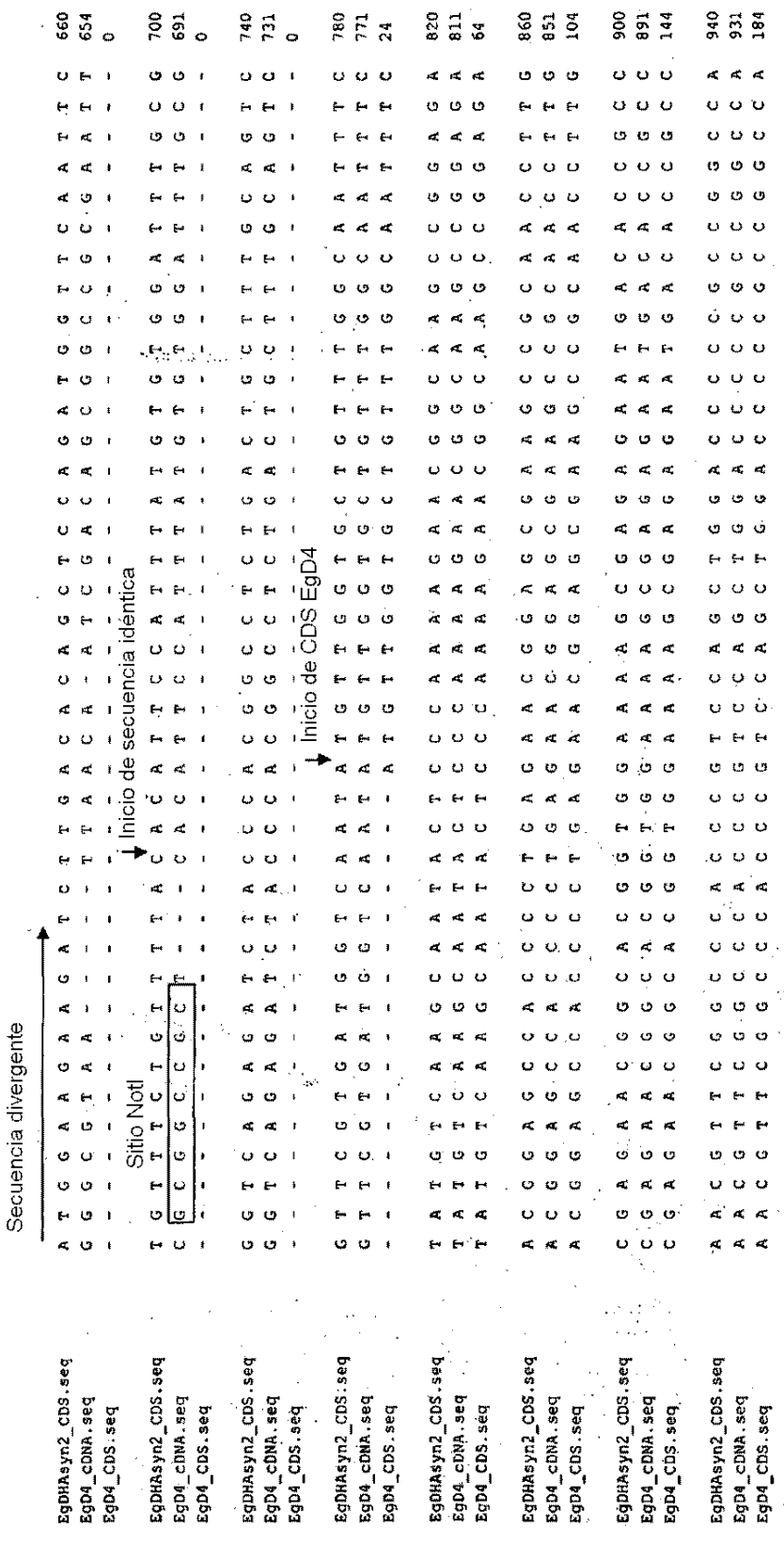

Secuencia divergente
Sitio NotI
Inicio de secuencia idéntica
Inicio de CDS EgD4
EgDHAsyn2_CDS.seq
EgD4_cDNA.seq
EgD4_CDS.seq
EgDHAsyn2_CDS es nt 620-921de ID de SEC N°:21, EgD4_cDNA e nt 620-921 de ID de SEC N°: 23 y
EgD4_CDS es nt 1-164 de ID de SEC N°: 24

FIG. 3A

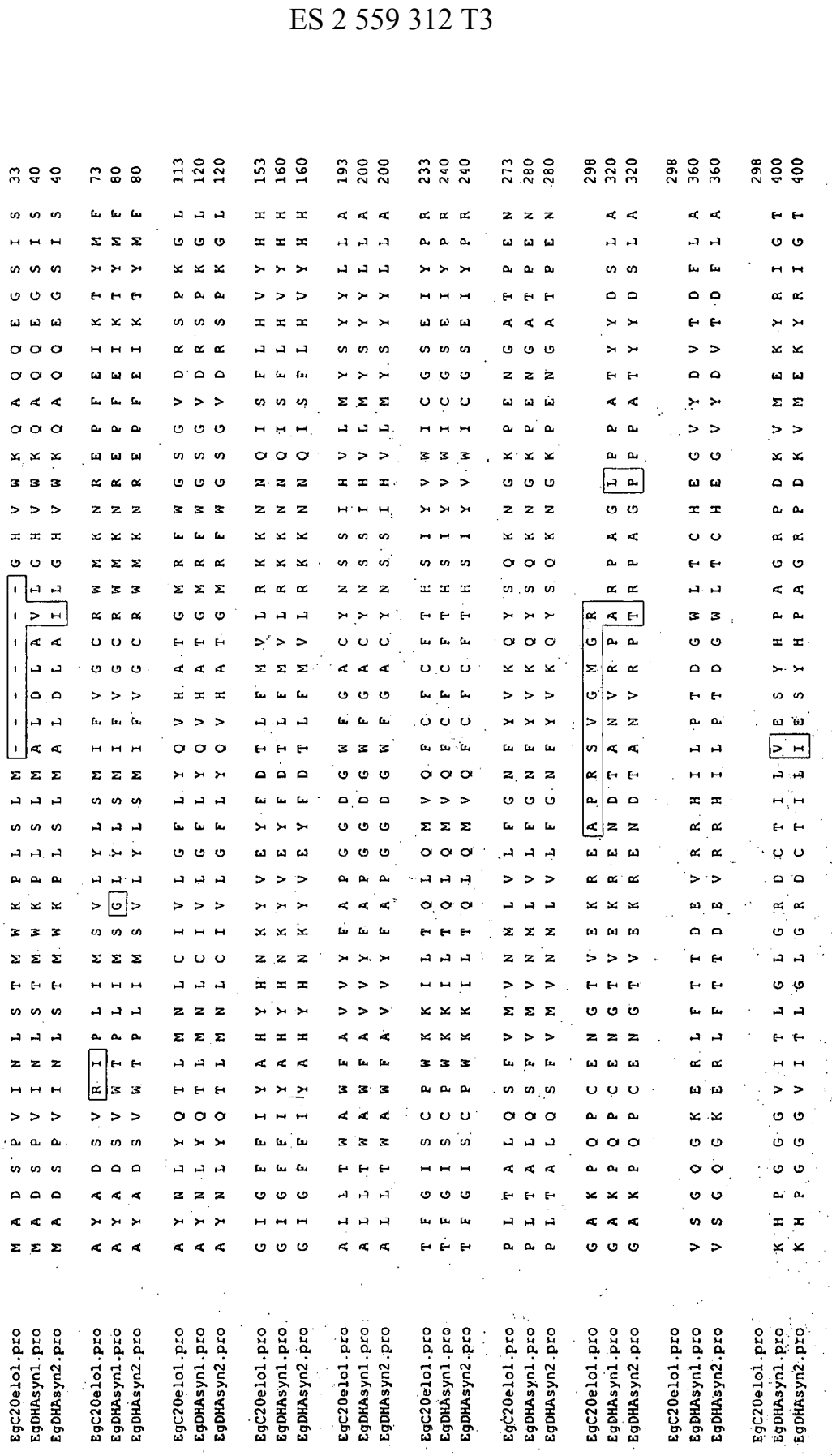


FIG. 3B

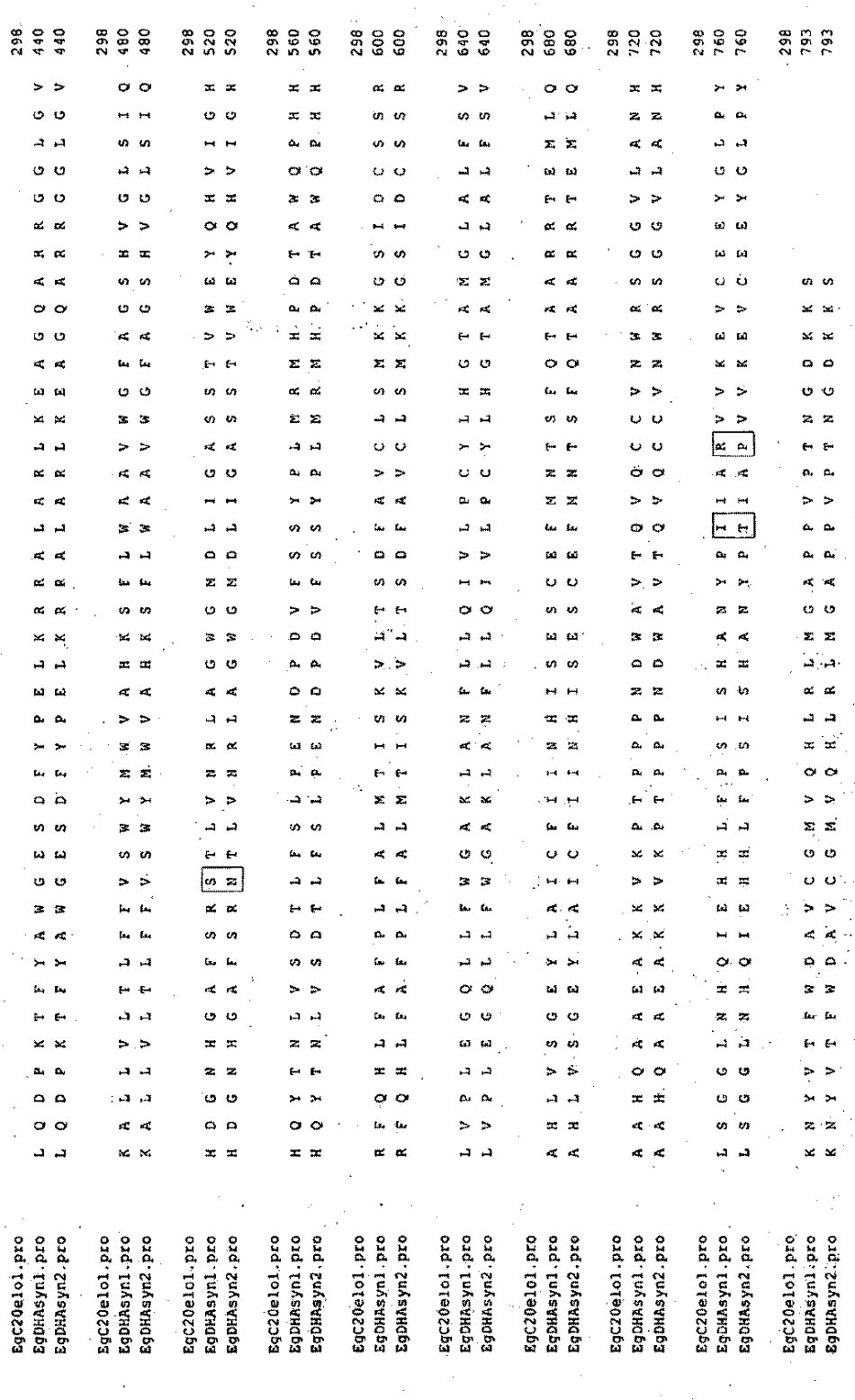

EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1.pro
EgDHAsyn1.pro
EgDHAsyn2.pro
EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6), EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº: 22)

FIG. 4A

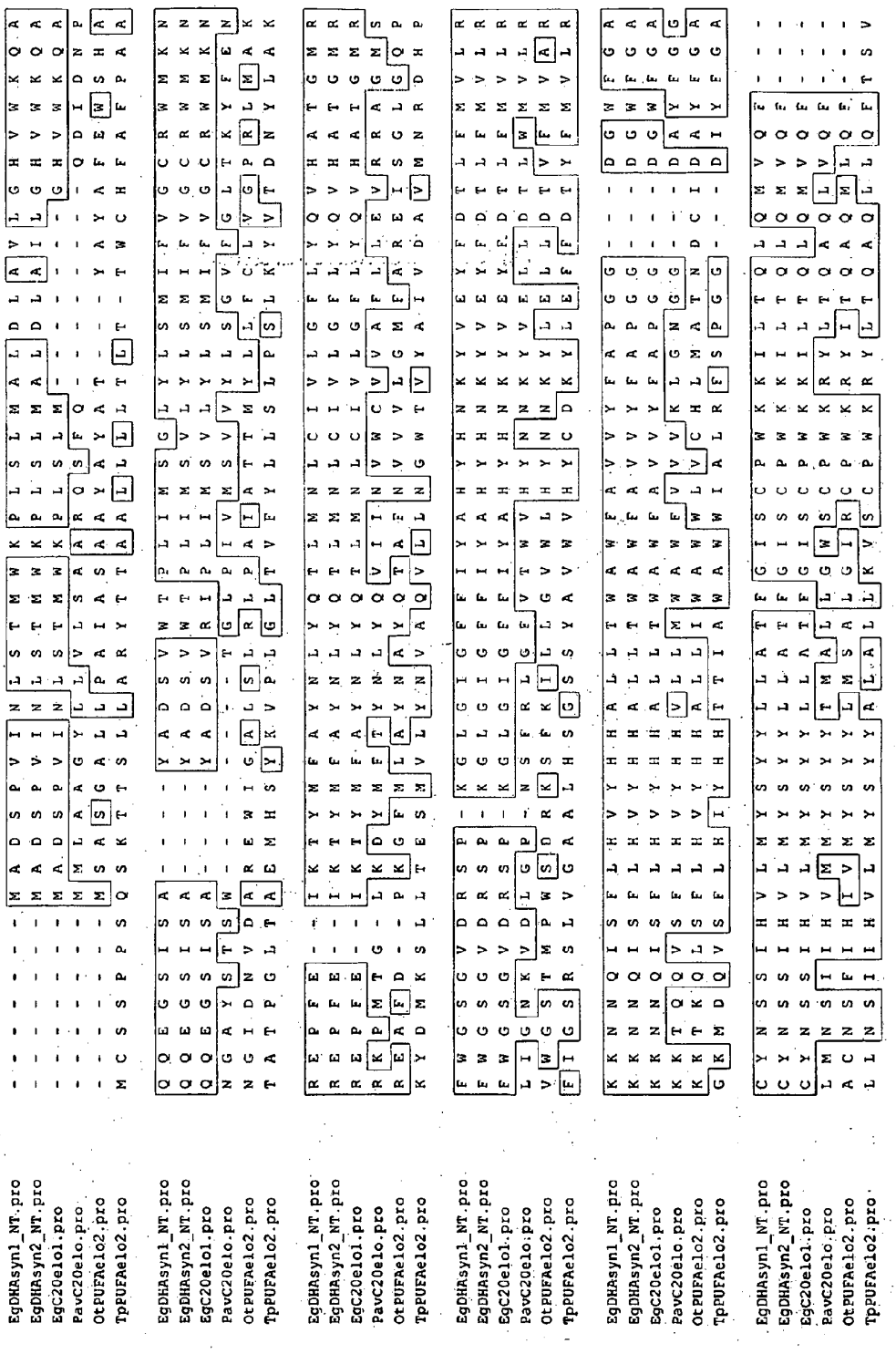
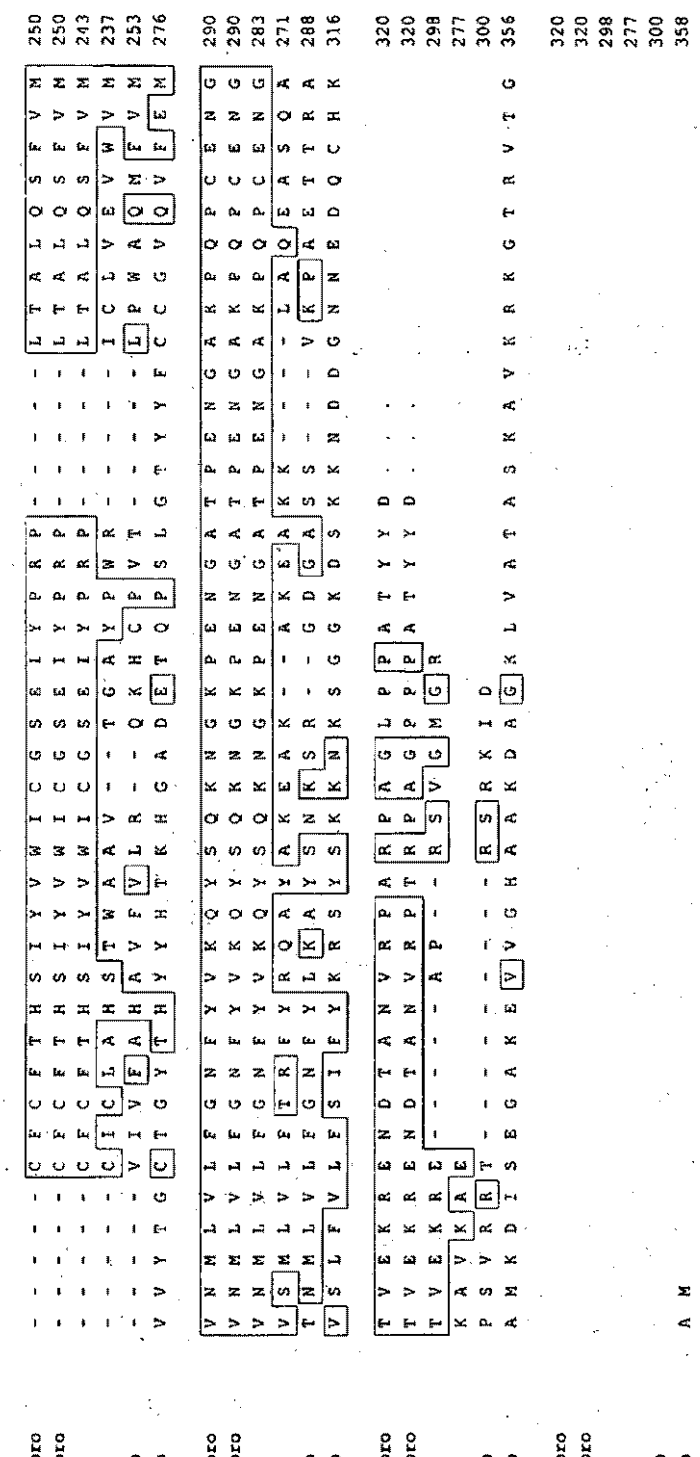

EgDHAsyn1_NT.pro
EgDHAsyn2_NT.pro
EgC20elo1.pro
PavC20elo.pro
OtPUFAelo2.pro
TpPUFAelo2.pro

FIG. 4B



N-término de EgDHAsyn1 (ID de SEC Nº: 12) y EgDHAsyn2 (ID de SEC Nº 22) con EgC20elo1 (ID de SEC Nº: 6), *Pavlova* sp. CCMP459 C20-PUFA Elo (ID de SEC Nº: 2), *Ostreococcus tauri* PUFA elongasa 2 (IOD de SEC Nº: 25) y *Thalassiosira pseudonana* PUFA elongasa 2 (ID de SEC Nº: 26).
Las proteínas *Pavlova*, *Ostreococcus* y *Thalassiosira* son etiquetadas como PavC20elo, OtPUFAelo2 y TpPUFAelo2, respectivamente.

FIG. 5A

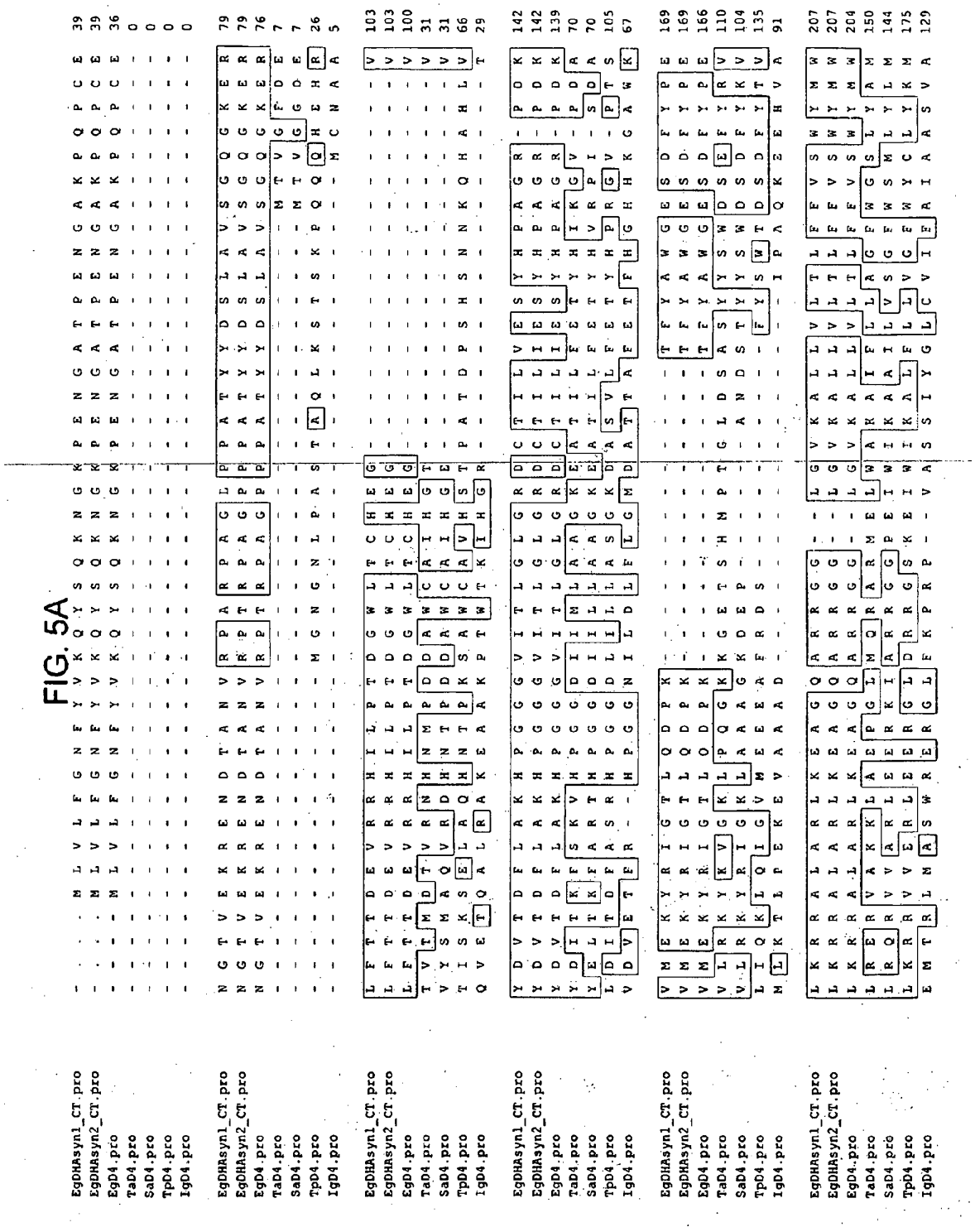

EgDHAsyn1_CT.pro
EgDHAsyn2_CT.pro
EgD4.pro
TaD4.pro
SaD4.pro
TpD4.pro
IgD4.pro

FIG. 5B

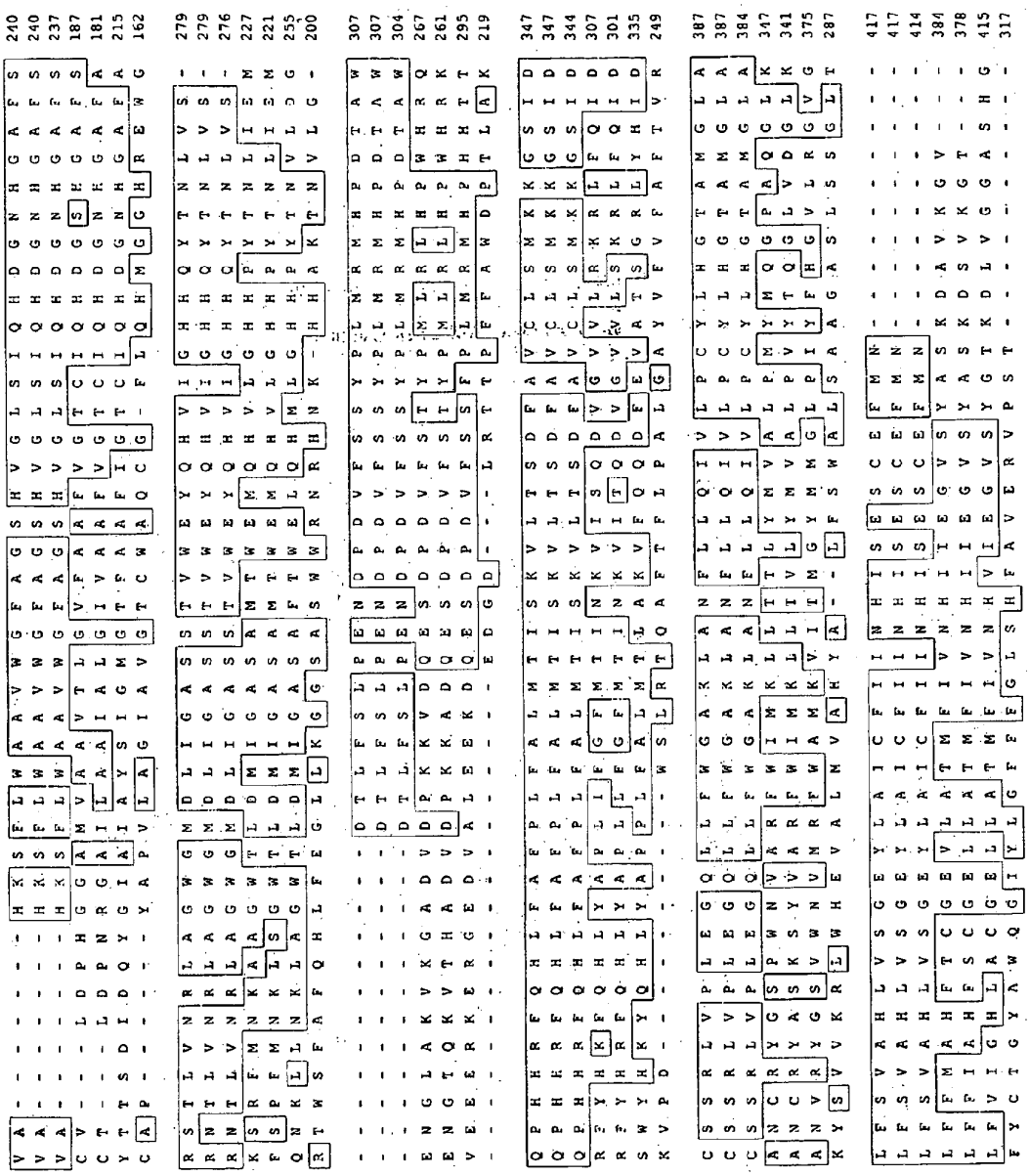

EgDHAsyn1_CT.pro
EgDHAsyn2_CT.pro
EgD4.pro
TaD4.pro
SaD4.pro
TpD4.pro
IgD4.pro

FIG. 5C

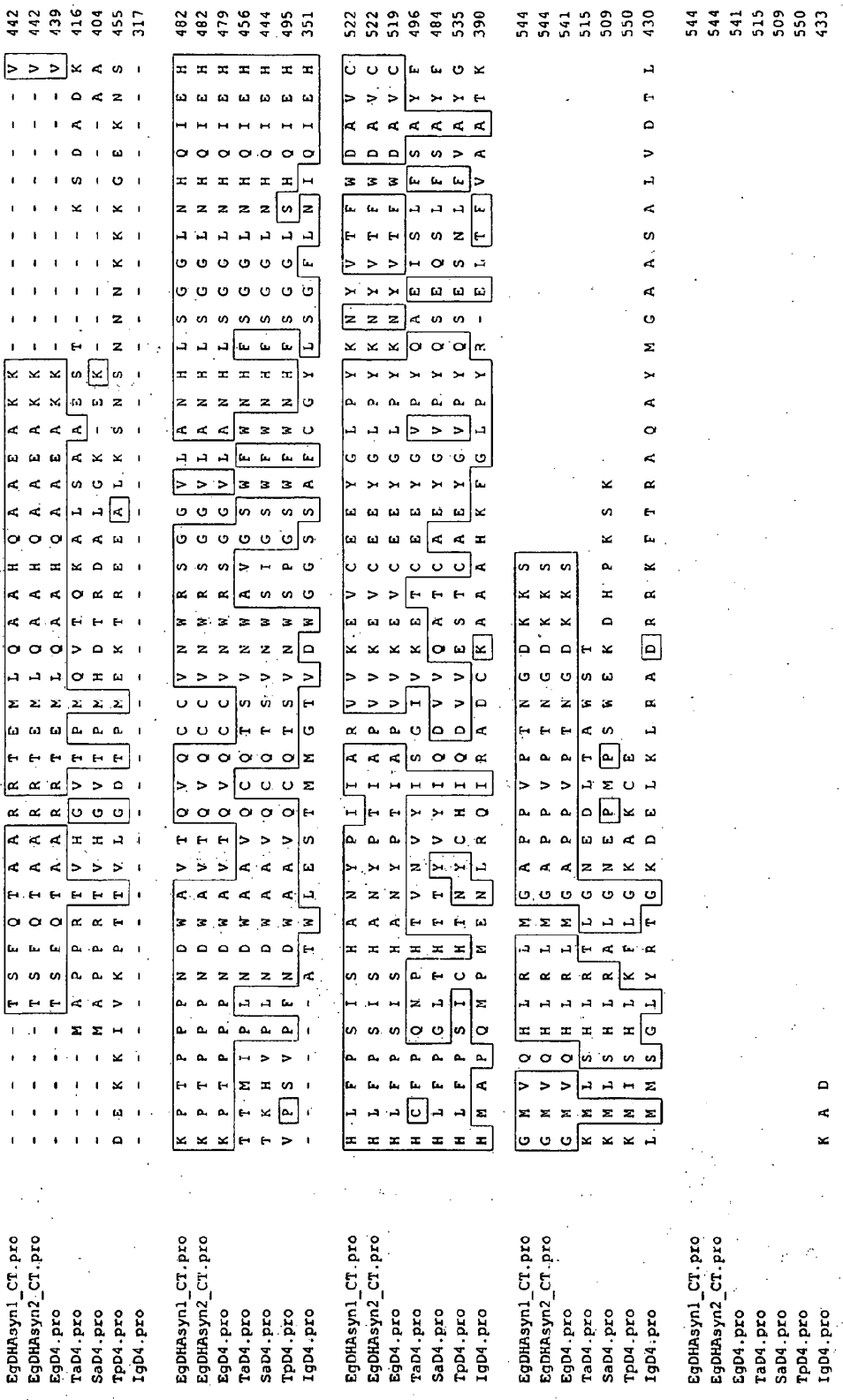
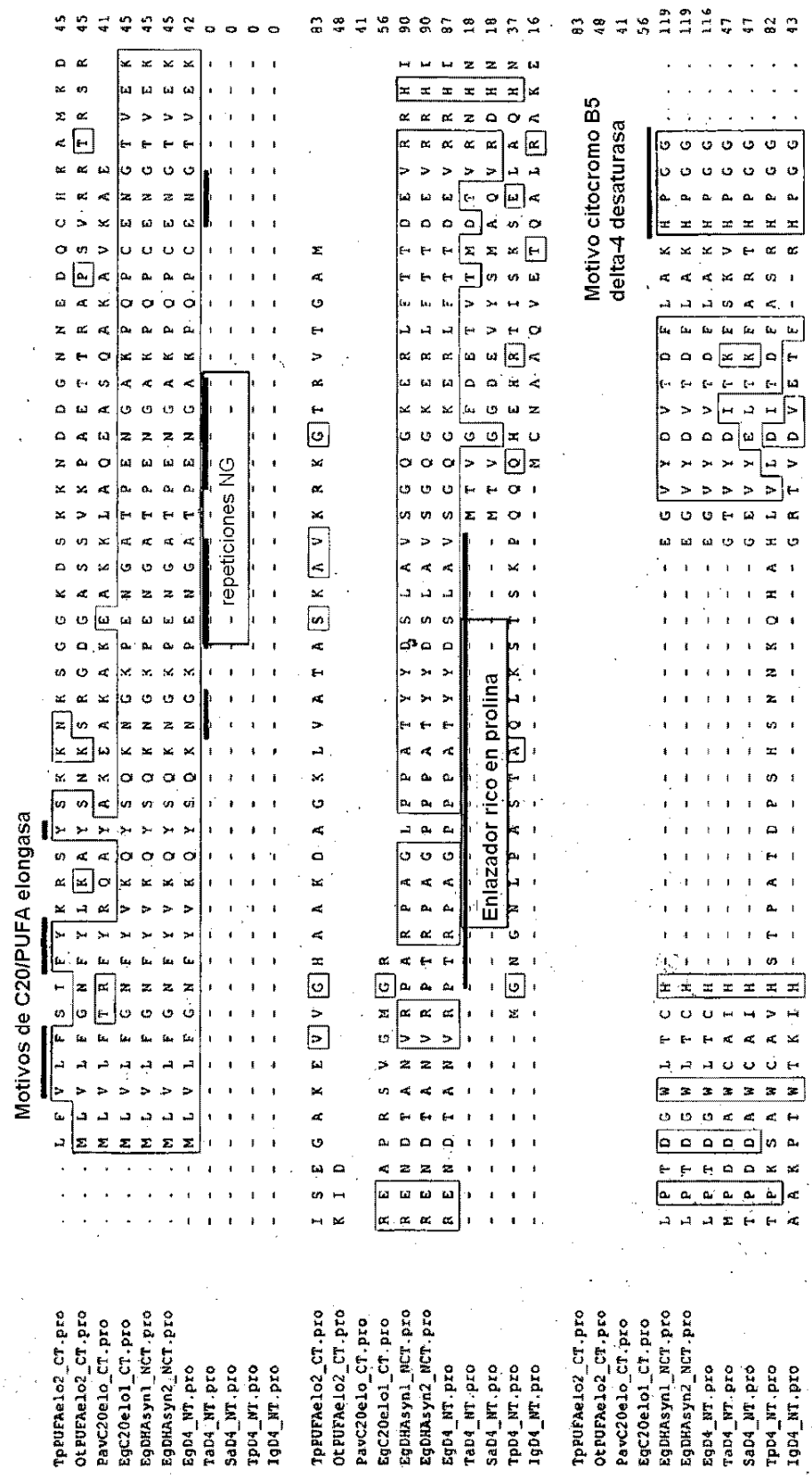

EgDHAsyn1_CT.pro
EgDHAsyn2_CT.pro
EgD4.pro
TaD4.pro
SaD4.pro
TpD4.pro
IgD4.pro

FIG. 5D

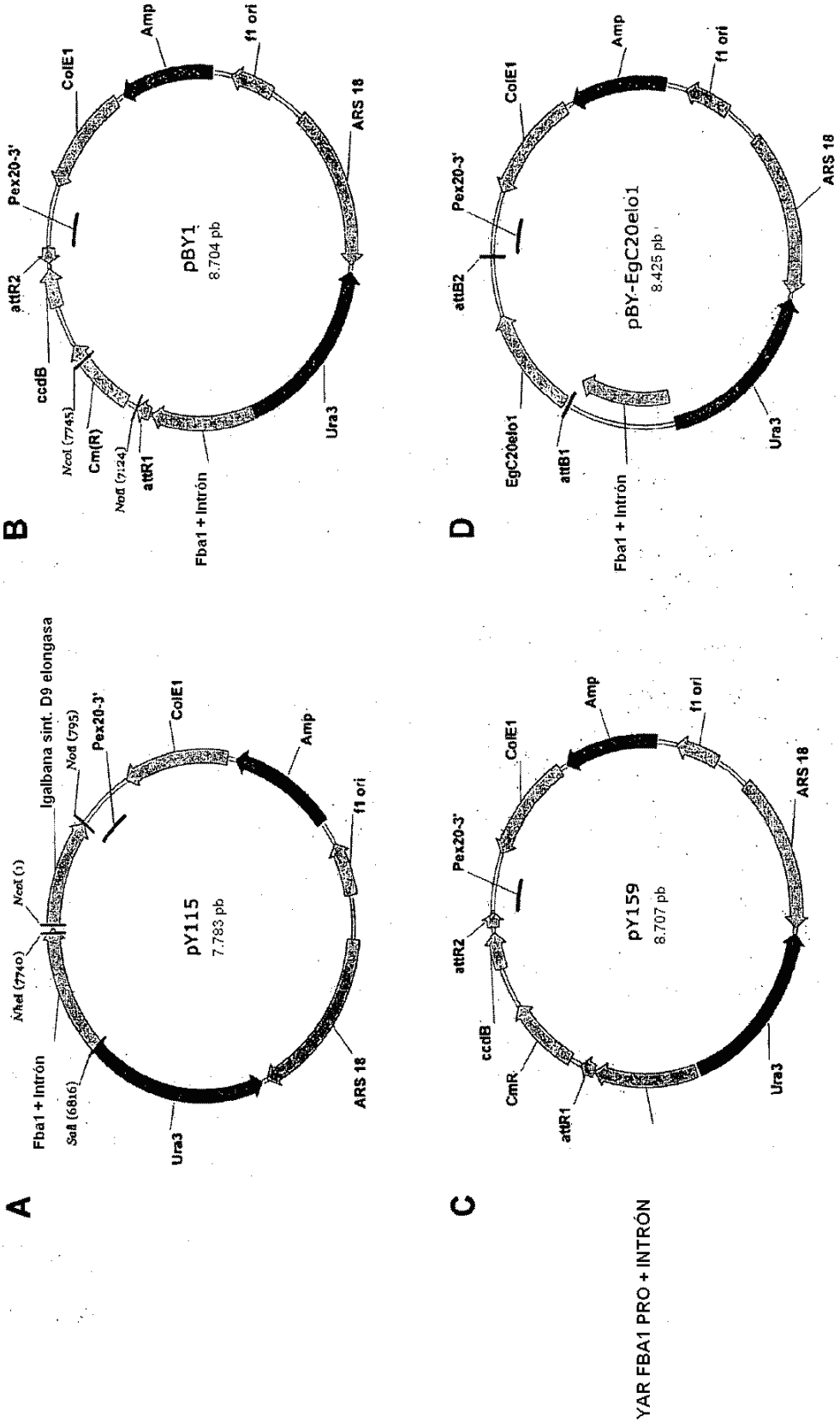
El alineamiento Clustal W incluye el C-término de EgDHAsyn1 (EgDHAsyn1_CT; aa 253-793 de ID de SEC Nº: 12; el N-término de EgDHAsyn1 no se muestra y es indicado mediante ...), EgDHAsyn2 (EgDHAsyn2_CT; aa 253-793 de ID de SEC Nº: 22, el N-término de EgDHAsyn2 no se muestra y es indicado mediante ...), *Euglena gracilis* delta-4 desaturasa de ácido graso (ID de SEC Nº: 13), *Thraustochytrium aureum* delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 27), *Schizochytrium aggregatum* delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº: 28), *Thalassiosira pseudonana* delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº 29) e *Isochrysis galbana* delta-4 desaturasa (ID de SEC Nº 30). Las proteínas *Euglena*, *Thraustochytrium*, *Thalassiosira* e *Isochrysis* son etiquetadas como EgD4, TaD4, TpD4 e IgD4, respectivamente.

FIG. 6



Se muestran EgDHAsyn1_CT (aa 253-365 de ID de SEC Nº: 12), EgDHAsyn2_NCT (aa 253-365 de ID de SEC Nº: 22), EgC20elo1_CT (aa 246-298 de ID de SEC Nº: 6), PavC20elo_CT (aa 240-277 de ID de SEC Nº: 2), OtPUFAelo2_CT (aa 256-300 de ID de SEC Nº: 25), TpPUFAelo2_CT (aa 279-358 de ID de SEC Nº: 26), EgD4_NT (aa 1-116 de ID de SEC Nº: 13), TaD4_NT (aa 1-47 de ID de SEC Nº: 27), SaD4_NT (aa 1-47 de ID de SEC Nº: 28), TpD4_NT (aa 1-82 de ID de SEC Nº: 29) e IgD4_NT (aa 1-43 de ID de SEC Nº: 30)

FIG. 7



YAR FBA1 PRO + INTRÓN

FIG. 8

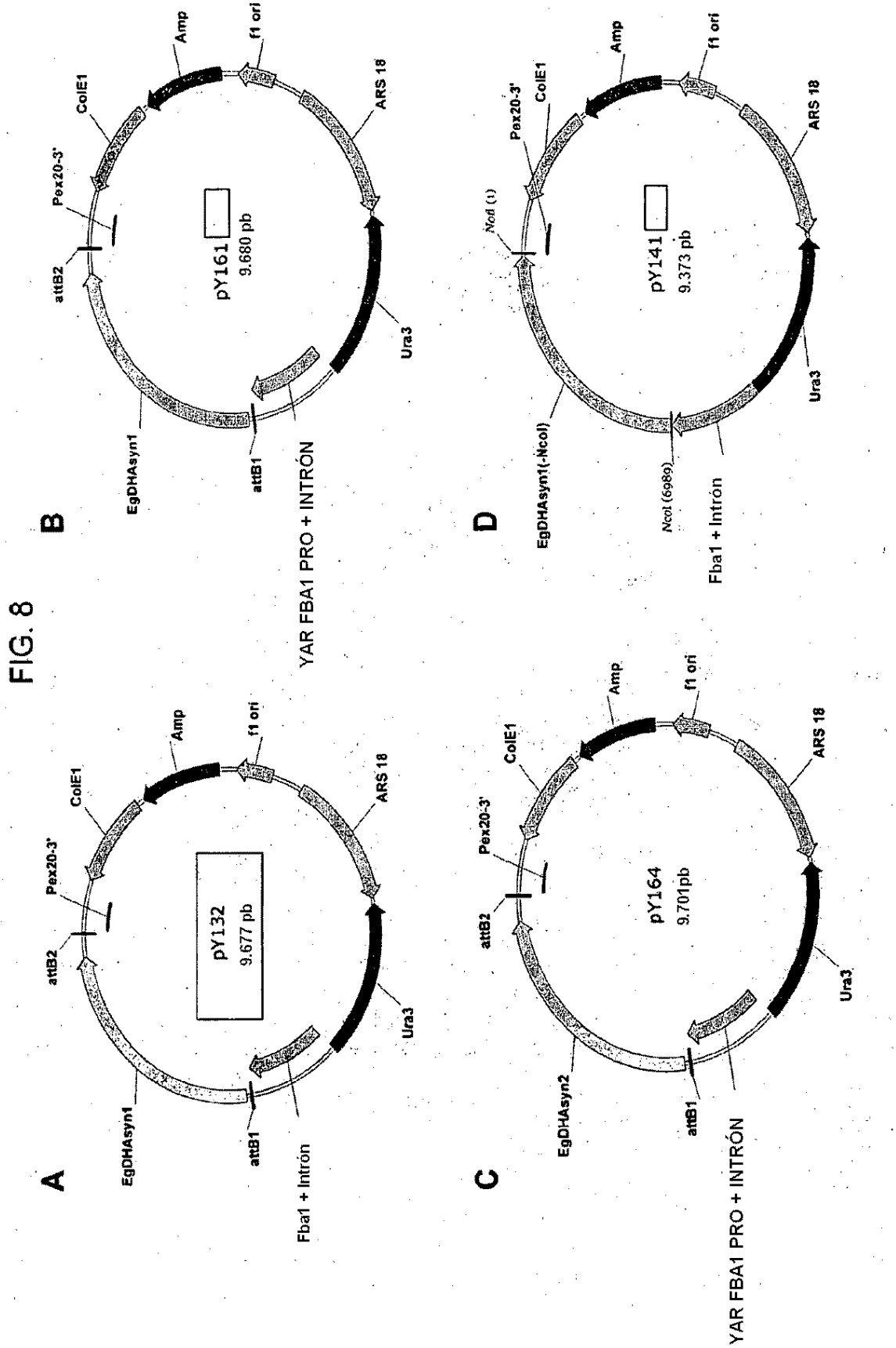

A
pY132
9.677 pb
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
attB1
EgDHAsyn1
Fba1 + Intrón
B
pY161
9.680 pb
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
attB1
EgDHAsyn1
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
C
pY164
9.701pb
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
attB1
EgDHAsyn2
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
D
pY141
9.373 pb
NotI (1)
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
NcoI (6989)
EgDHAsyn1(-NcoI)
Fba1 + Intrón

FIG. 9

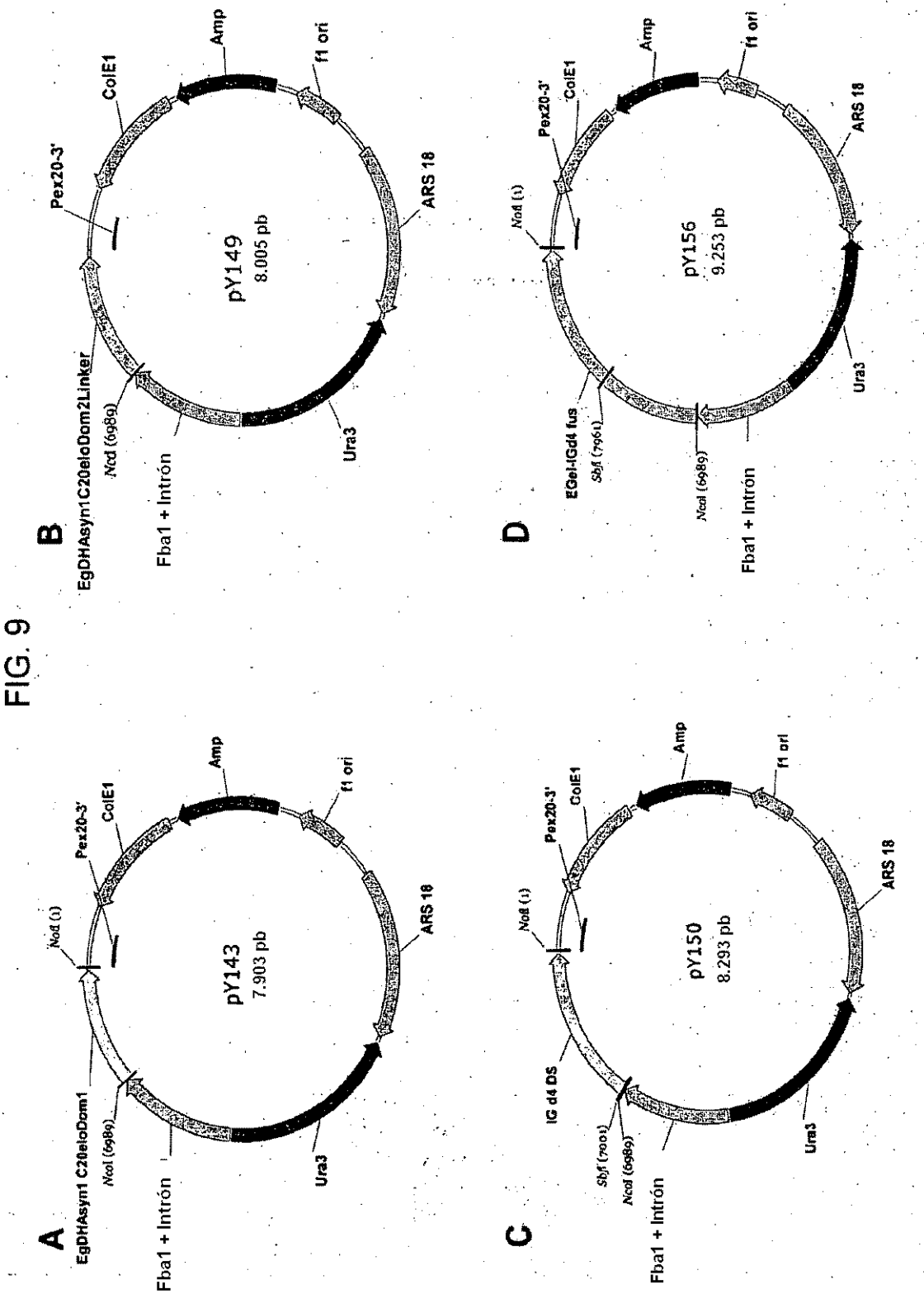

A
EgDHAsyn1 C20eloDom1
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
Fba1 + Intrón
NotI (1)
NcoI (6989)
pY143
7.903 pb
B
EgDHAsyn1C20eloDom2Linker
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
Fba1 + Intrón
NcoI (6989)
pY149
8.005 pb
C
IG d4 DS
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
Fba1 + Intrón
NotI (1)
SbfI (7001)
NcoI (6989)
pY150
8.293 pb
D
EGel-IGd4 fus
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
Fba1 + Intrón
NotI (1)
SbfI (7061)
NcoI (6989)
pY156
9.253 pb

FIG. 10

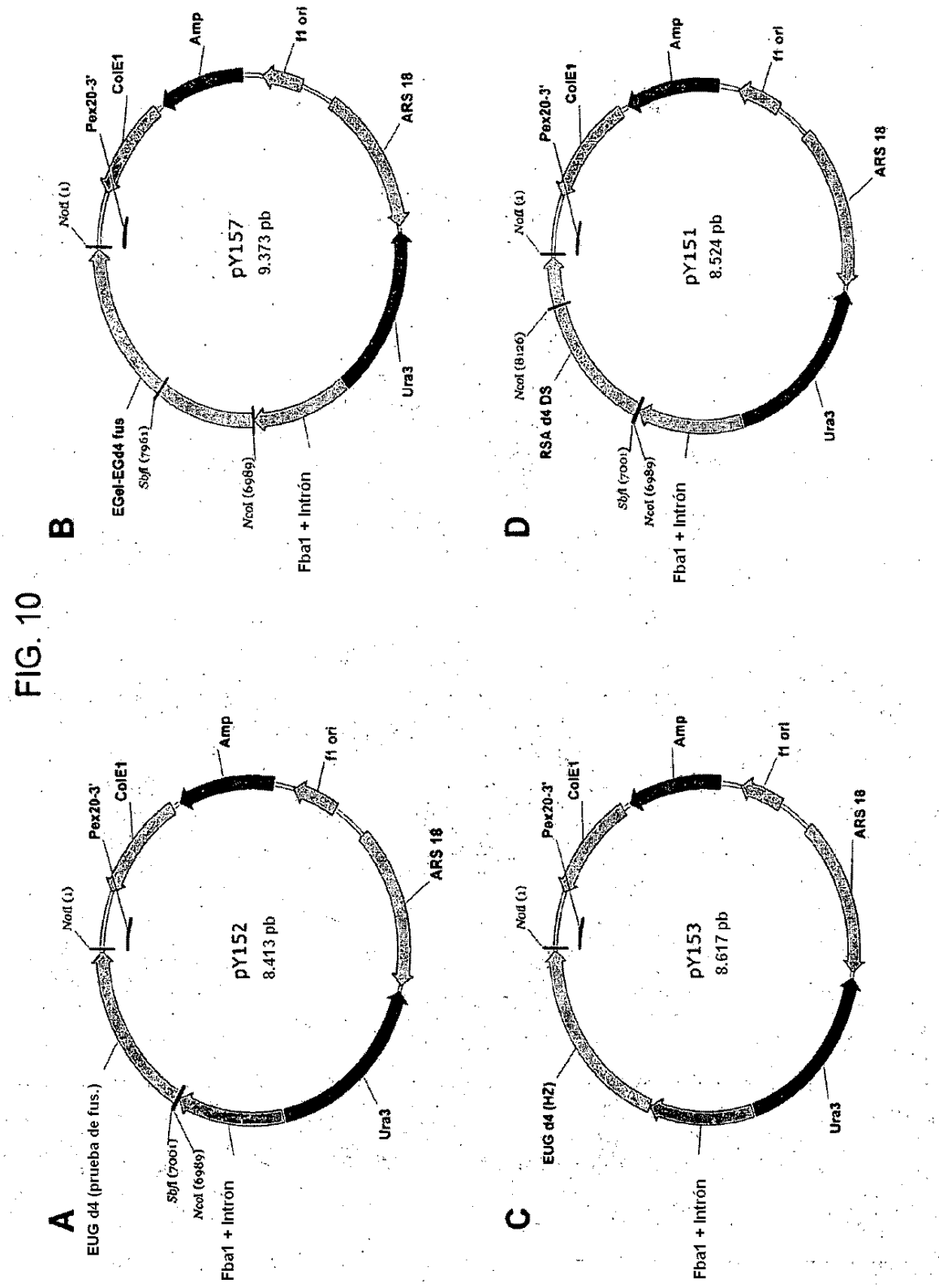

A
EUG d4 (prueba de fus.)
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
NotI (1)
pY152
8.413 pb
Ura3
SbfI (7001)
NcoI (6989)
Fba1 + Intrón
B
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
NotI (1)
pY157
9.373 pb
EGel-EGd4 fus
SbfI (7961)
NcoI (6989)
Ura3
Fba1 + Intrón
C
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
NotI (1)
pY153
8.617 pb
EUG d4 (HZ)
Ura3
Fba1 + Intrón
D
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
NotI (1)
pY151
8.524 pb
NcoI (8126)
RSA d4 DS
SbfI (7001)
NcoI (6989)
Ura3
Fba1 + Intrón

FIG. 11

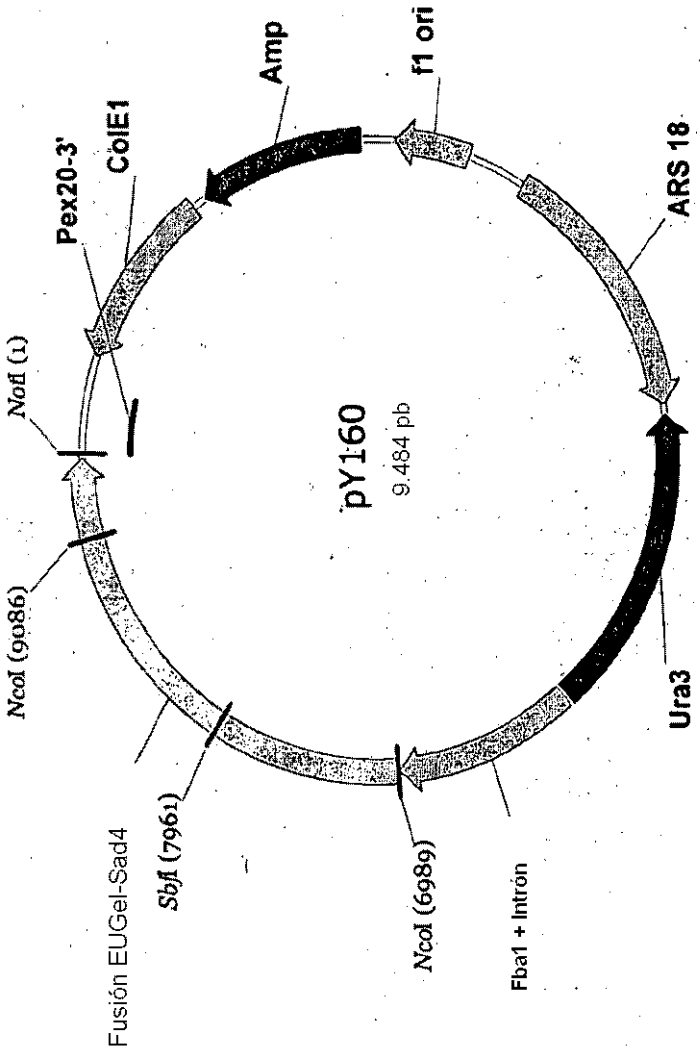

pY160
9.484 pb
Amp
f1 ori
ARS 18
Ura3
Fba1 + Intrón
NcoI (6989)
SbfI (7961)
Fusión EUGel-Sad4
NcoI (9086)
NotI (1)
Pex20-3'
ColE1

FIG. 12

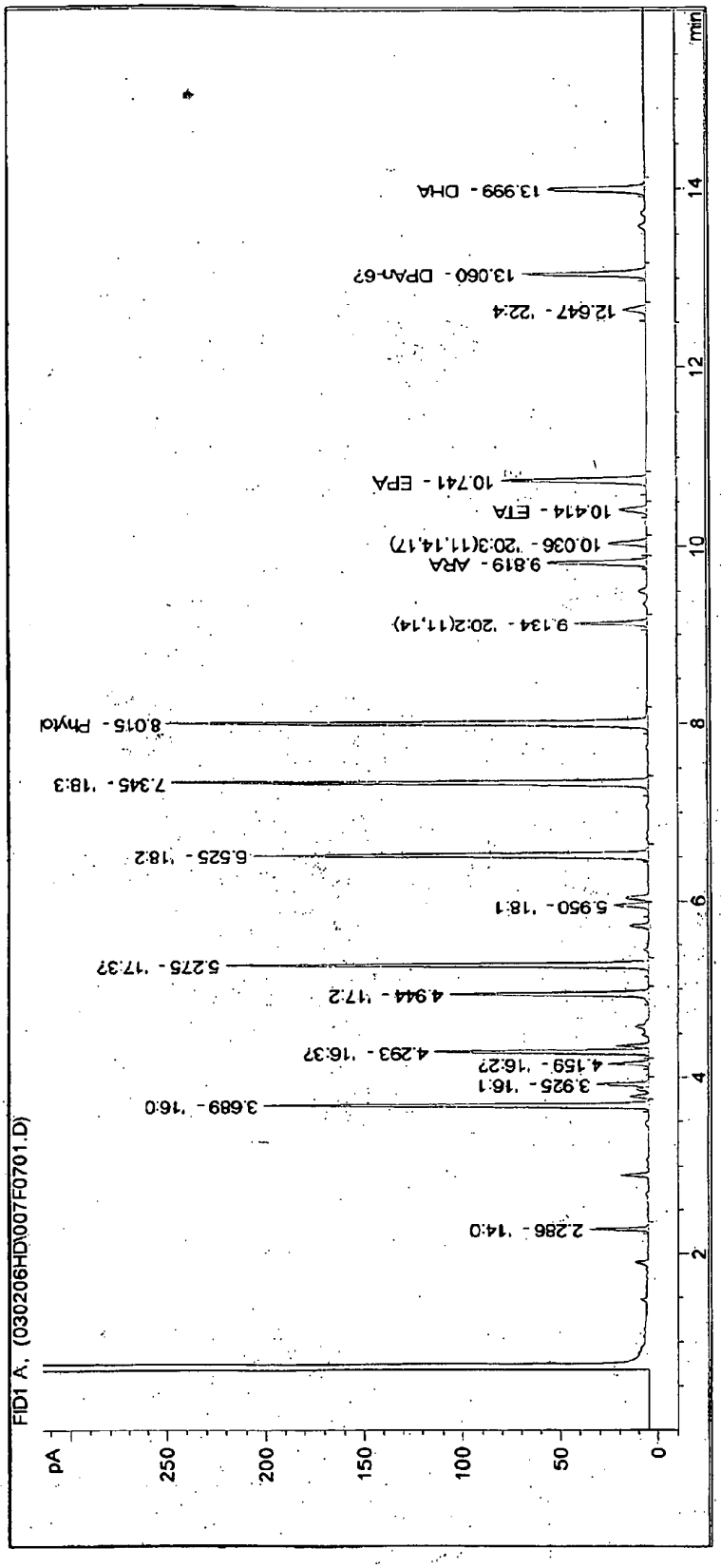

FID1 A, (030206HD\007F0701.D)
pA
250
200
150
100
50
0
min
2
4
6
8
10
12
14
2.286 - 14:0
3.689 - 16:0
3.925 - 16:1
4.159 - 16:2?
4.293 - 16:3?
4.944 - 17:2
5.275 - 17:3?
5.950 - 18:1
6.525 - 18:2
7.345 - 18:3
8.015 - Phytol
9.134 - 20:2(11,14)
9.819 - ARA
10.036 - 20:3(11,14,17)
10.414 - ETA
10.741 - EPA
12.647 - 22:4
13.060 - DPAn-6?
13.999 - DHA

FIG. 13A

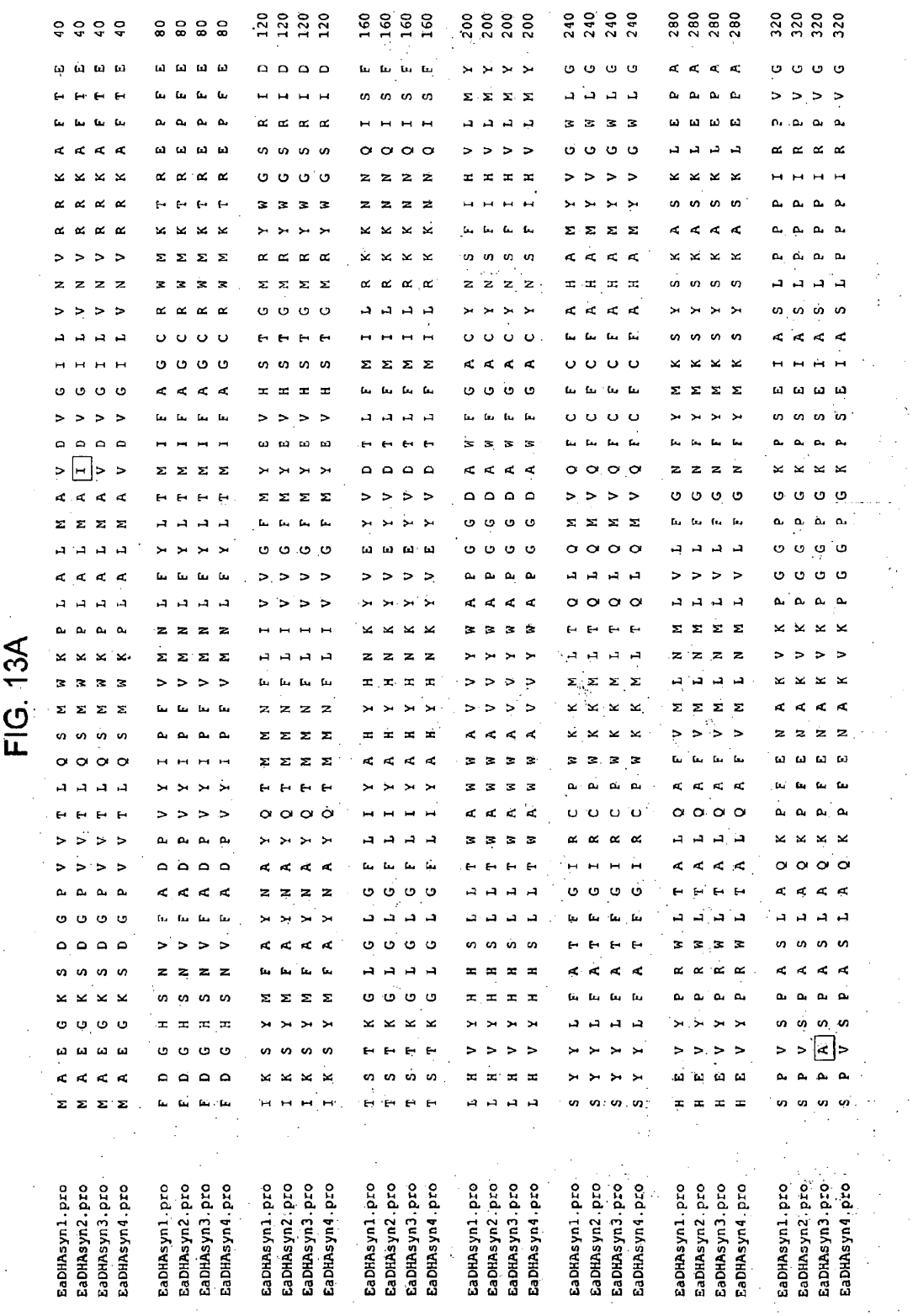


FIG. 13B

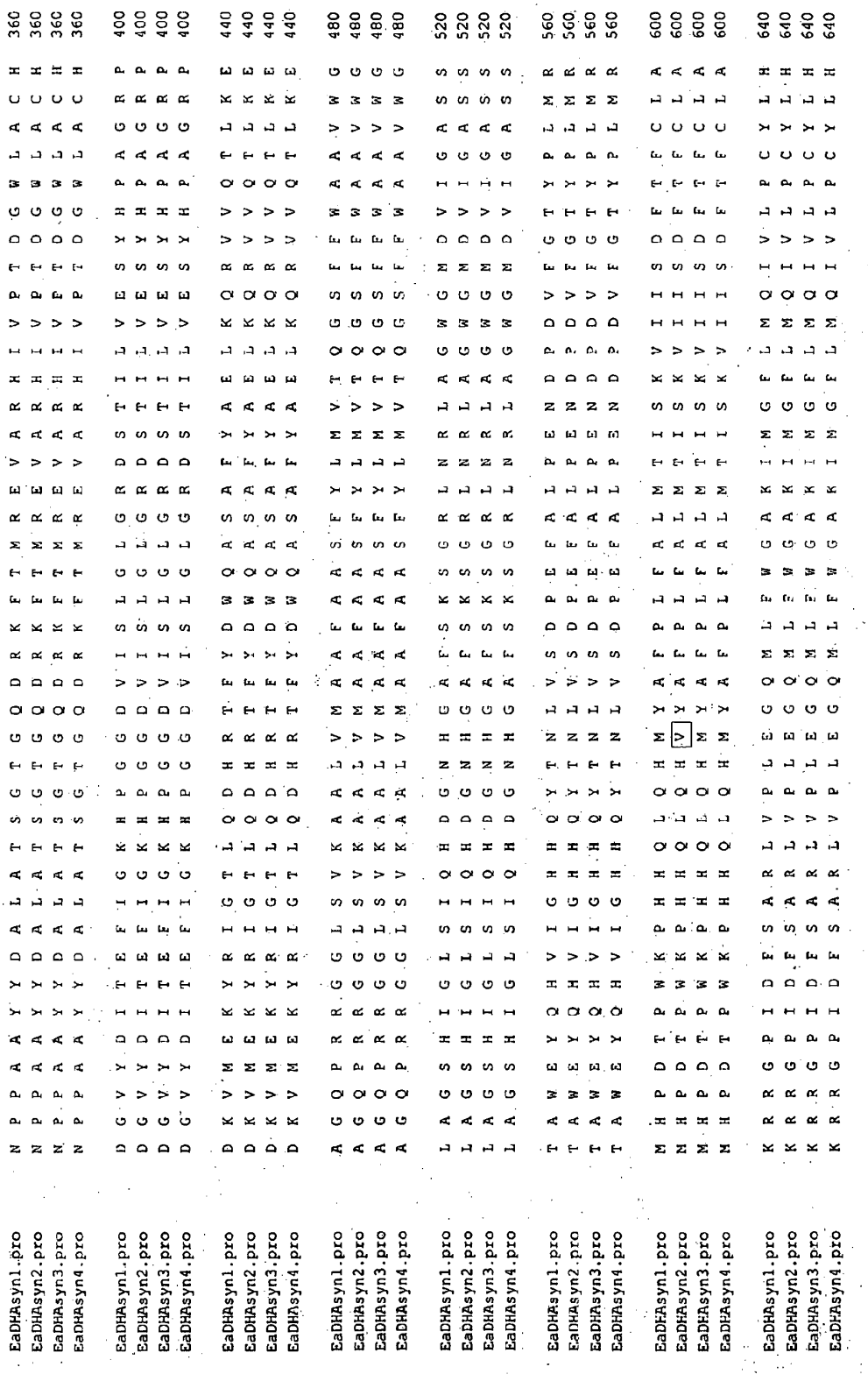
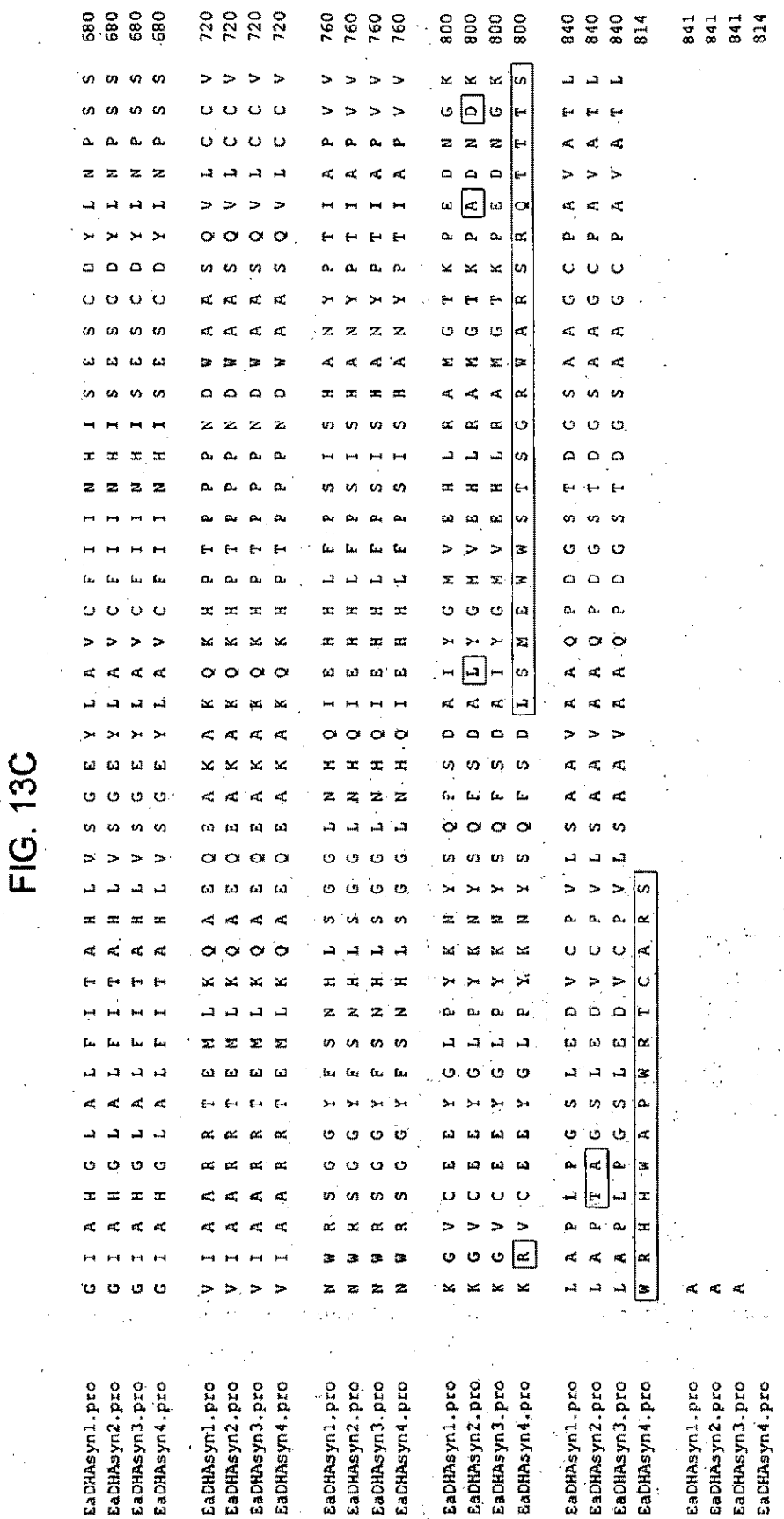


FIG. 13C



EaDHAsyn1 es ID de SEC Nº: 95;
EaDHAsyn2 es ID de SEC Nº: 96;
EaDHAsyn3 es ID de SEC Nº: 97;
EaDHAsyn4 es ID de SEC Nº: 98.

FIG. 14

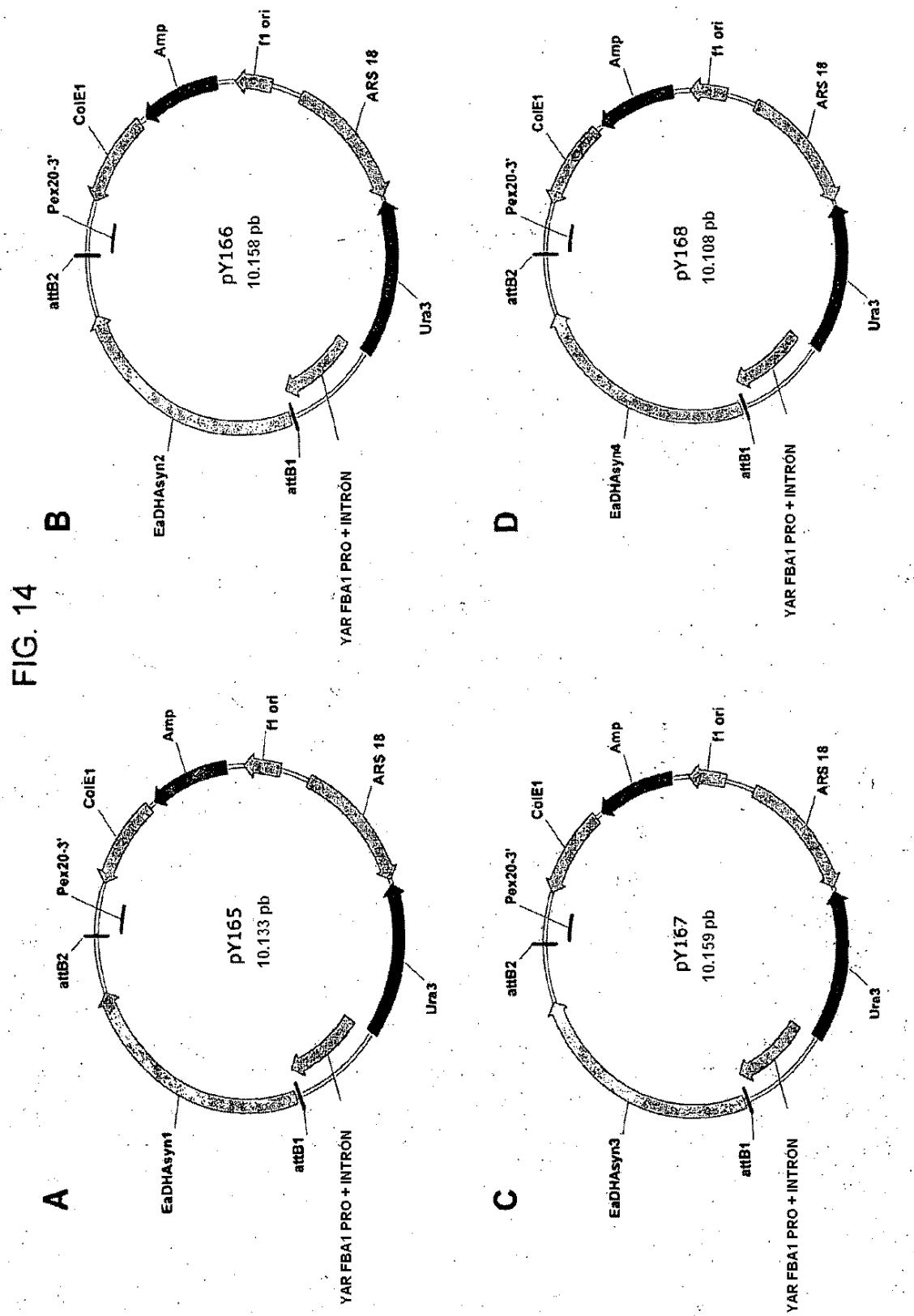

A
pY165
10.133 pb
EaDHAsyn1
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
attB1
Ura3
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
B
pY166
10.158 pb
EaDHAsyn2
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
attB1
Ura3
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
C
pY167
10.159 pb
EaDHAsyn3
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
attB1
Ura3
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
D
pY168
10.108 pb
EaDHAsyn4
YAR FBA1 PRO + INTRÓN
attB1
Ura3
attB2
Pex20-3'
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18

FIG. 15

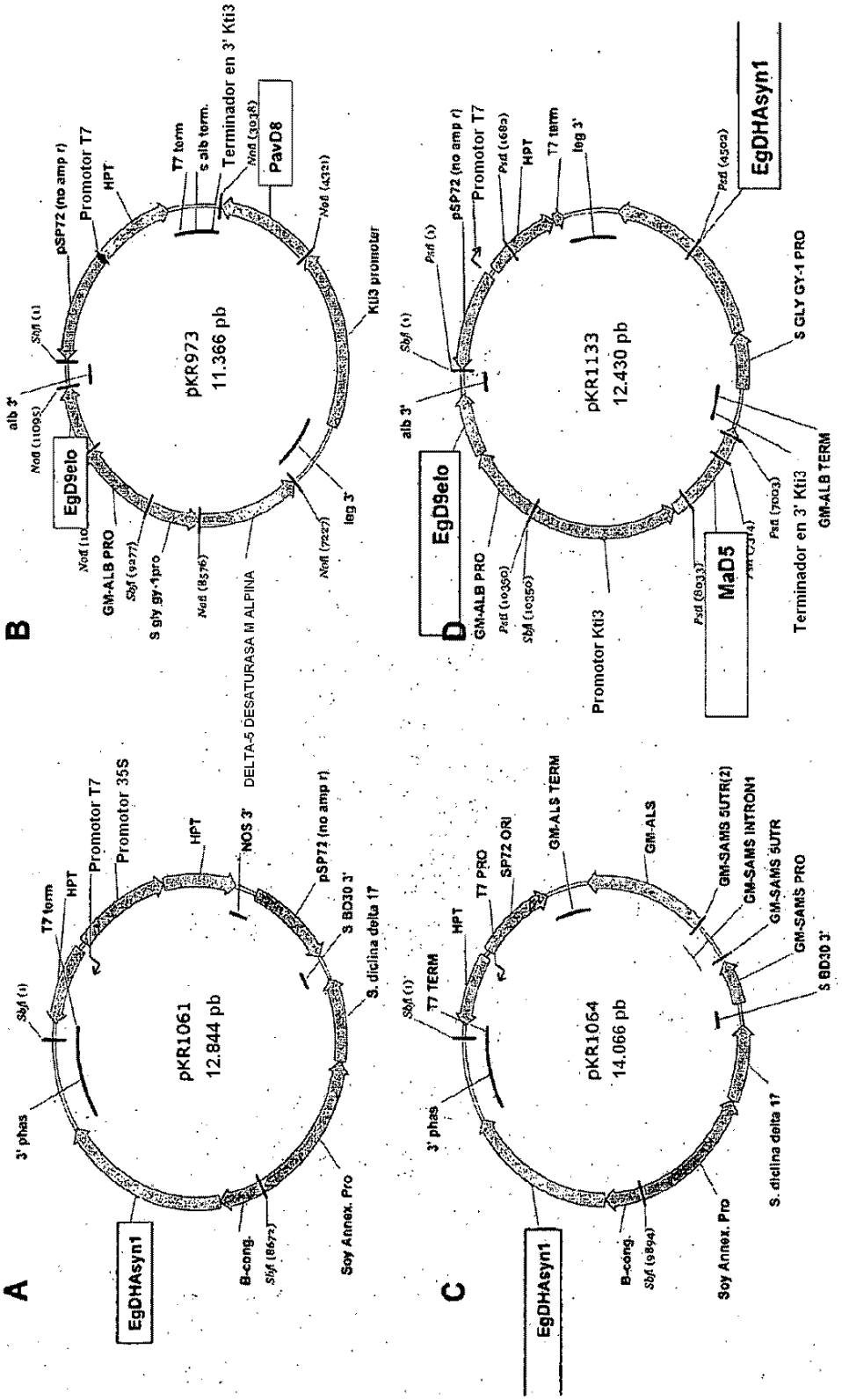

A
pKR1061
12.844 pb
EgDHAsyn1
3' phas
T7 term
HPT
Promotor T7
Promotor 35S
NOS 3'
DELTA-5 DESATURASA M ALPINA
pSP72 (no amp r)
S BD30 3'
S. diclina delta 17
Soy Annex. Pro
B-cong.
B
pKR973
11.366 pb
EgD9elo
alb 3'
pSP72 (no amp r)
Promotor T7
HPT
T7 term
s alb term.
Terminador en 3' Kti3
PavD8
Kti3 promoter
GM-ALB PRO
S gly gy-1pro
leg 3'
C
pKR1064
14.066 pb
EgDHAsyn1
3' phas
T7 TERM
HPT
T7 PRO
SP72 ORI
GM-ALS TERM
GM-ALS
GM-SAMS 5UTR(2)
GM-SAMS INTRON1
GM-SAMS 5UTR
GM-SAMS PRO
S BD30 3'
S. diclina delta 17
Soy Annex. Pro
B-cong.
D
pKR1133
12.430 pb
EgD9elo
alb 3'
pSP72 (no amp r)
Promotor T7
HPT
T7 term
leg 3'
EgDHAsyn1
S GLY GY-1 PRO
GM-ALB TERM
Terminador en 3' Kti3
Promotor Kti3
GM-ALB PRO
MaD5

FIG. 16

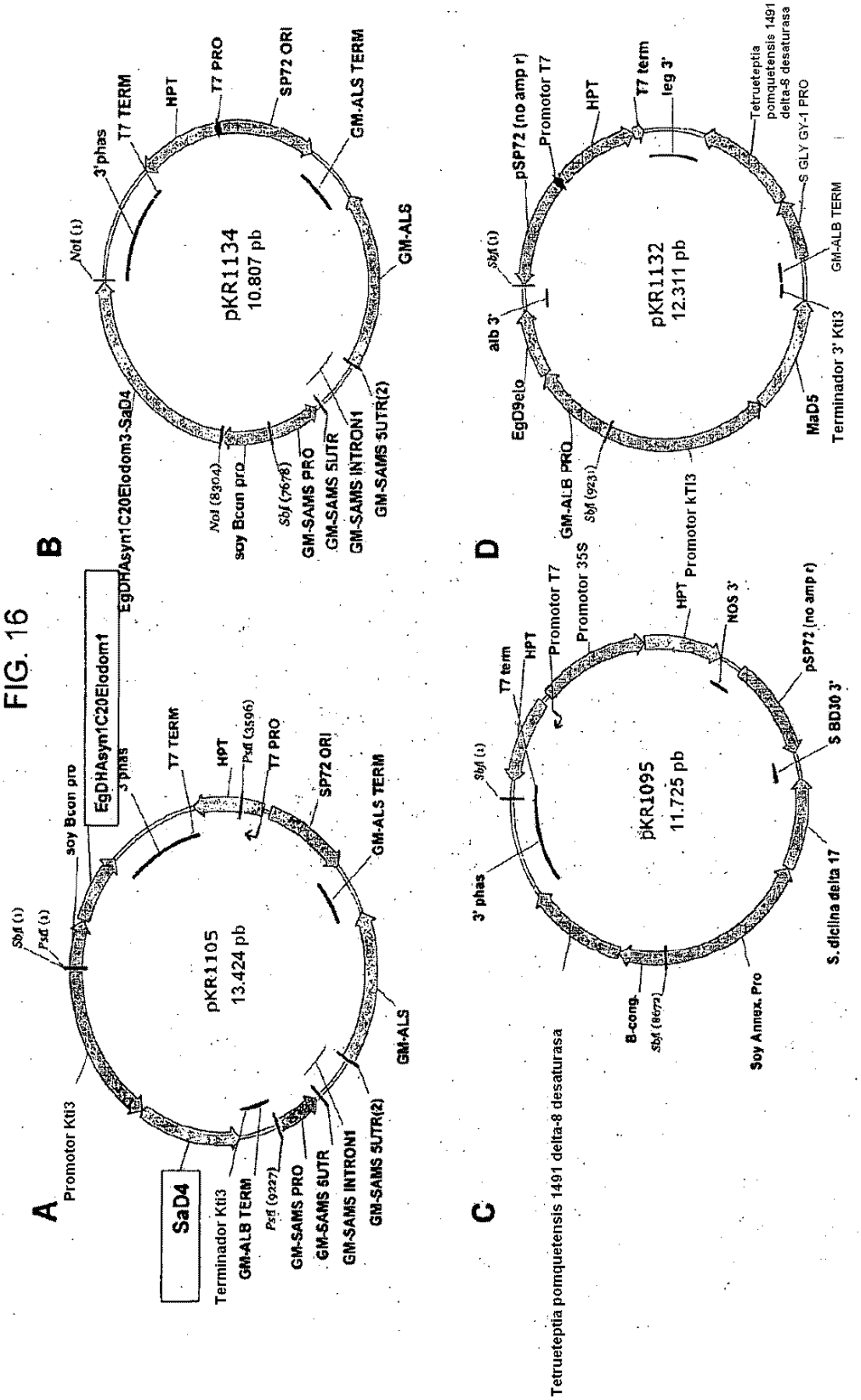

A
Promotor Kti3
SaD4
Terminador Kti3
GM-ALB TERM
GM-SAMS PRO
GM-SAMS 5UTR
GM-SAMS INTRON1
GM-SAMS 5UTR(2)
GM-ALS
GM-ALS TERM
SP72 ORI
T7 PRO
HPT
T7 TERM
3' phas
soy Bcon pro
EgDHAsyn1C20Elodom1
Sbf (1)
Psd (1)
Psd (3596)
Psd (9227)
pKR1105
13.424 pb
B
EgDHAsyn1C20Elodom3-SaD4
Not (1)
Not (8304)
Sbf (7678)
pKR1134
10.807 pb
C
Tetruetepiia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa
3' phas
Sbf (1)
T7 term
HPT
Promotor T7
Promotor 35S
HPT
Promotor kTI3
NOS 3'
pSP72 (no amp r)
S BD30 3'
S. diclina delta 17
B-cong
Sbf (8672)
Soy Annex. Pro
pKR1095
11.725 pb
D
pSP72 (no amp r)
Promotor T7
alb 3'
Sbf (1)
EgD9elo
GM-ALB PRO
Sbf (9231)
HPT
T7 term
leg 3'
Tetruetepiia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa
S GLY GY-1 PRO
MaD5
Terminador 3' Kti3
GM-ALB TERM
pKR1132
12.311 pb

FIG. 17

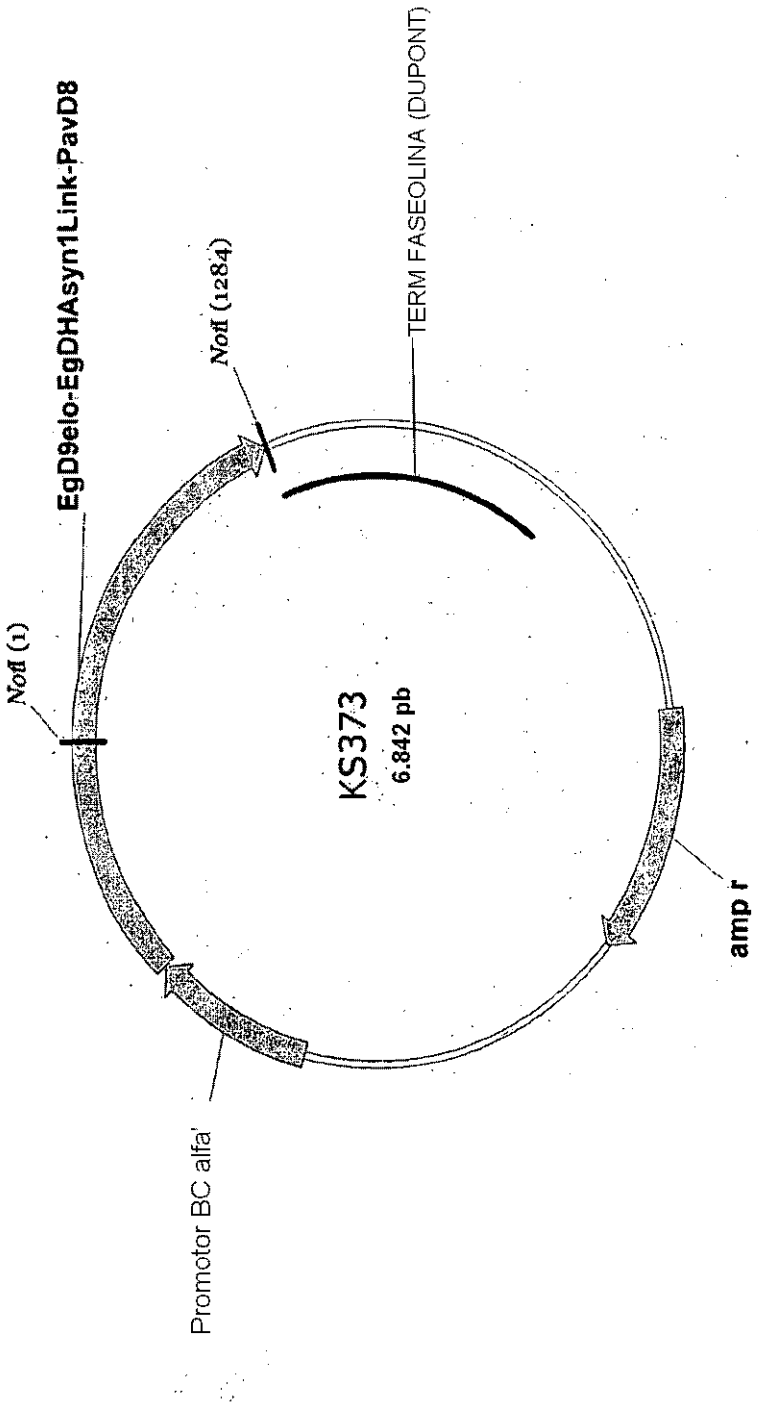

EgD9elo-EgDHAsyn1Link-PavD8
NotI (1284)
TERM FASEOLINA (DUPONT)
NotI (1)
KS373
6.842 pb
amp r
Promotor BC alfa'

FIG. 18

Gen	Vector	16:0	16:1	17:1 (9)	18:0	18:1	18:2	EPA	DPA	DHA	% elong. C20	% desat. D4	% promedio de elong. C20	% promedio de desat. D4
EgDHAsyn1	pY132-1	13.3	6.7	1.1	0.8	19.4	42.2	12.8	2.8	0.9	22.3	24.3	22.3	24.3
EgDHAsyn1	pY141-1	13.3	6.5	1.2	0.8	22.0	38.1	16.2	1.5	0.4	10.5	22.6	10.5	22.6
EgDHAsyn1	pY161-1	13.1	6.5	1.1	0.9	20.7	41.4	15.2	1.0	0.2	7.5	16.6	7.5	16.5
	pY161-2	13.0	6.4	1.1	0.9	20.9	41.4	15.2	1.0	0.2	7.5	16.4		
EgDHAsyn2	pY164-2	13.1	6.2	1.2	0.9	20.4	41.5	15.9	0.8	0.2	5.8	18.0	5.7	16.9
	pY164-3	13.1	6.3	1.1	1.1	23.5	39.2	14.8	0.7	0.1	5.6	15.8		
EaDHAsyn1	pY165-1	13.2	6.2	1.1	1.0	21.7	40.7	14.9	1.0	0.2	7.4	17.0	6.4	17.4
	pY165-2	13.2	6.4	1.2	0.9	23.1	36.6	17.5	0.8	0.2	5.4	17.8		
EaDHAsyn2	pY166-1	13.3	6.6	1.0	1.0	24.9	37.6	14.0	1.3	0.2	9.9	14.7	9.5	16.3
	pY166-2	13.4	6.0	1.1	1.0	21.4	40.2	15.4	1.3	0.3	9.2	18.4		
	pY166-3	13.1	6.4	1.1	1.1	23.5	38.4	14.9	1.3	0.2	9.5	15.7		
EaDHAsyn3	pY167-1	13.4	6.0	1.1	1.0	21.5	40.3	15.3	1.1	0.2	8.0	17.7	8.0	17.2
	pY167-2	13.2	6.1	1.1	1.0	21.0	40.7	15.5	1.1	0.2	8.0	17.5		
	pY167-3	13.0	6.5	1.1	1.0	22.6	38.6	15.9	1.2	0.2	8.1	16.4		
EaDHAsyn4	pY168-1	13.0	6.2	1.1	0.9	21.9	40.5	16.2	0.2	0.0	1.0	0.0	1.1	0.0
	pY168-2	12.9	6.2	1.0	1.2	25.7	34.0	18.8	0.2	0.0	1.1	0.0		
	pY168-3	13.3	6.3	1.1	1.0	23.2	39.5	15.4	0.2	0.0	1.0	0.0		

ES 2 559 312 T3

FIG. 19

Gen	Vector	16:0	16:1	17:1 (9)	18:0	18:1	18:2	EPA	DPA	DHA	% elong. C20	% desat. D4	% promed. elong. C20	% promedio desat. D4
Vector de control	pGPD	11.1	6.7	1.1	1.8	52.9	12.3	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EgDHAsyn1	pY141-1	11.0	7.0	1.1	1.8	52.5	14.0	10.5	1.2	0.1	10.8	5.1	10.6	5.5
	pY141-2	10.9	7.1	1.1	1.8	52.7	13.9	10.5	1.2	0.1	10.8	5.0		
	pY141-3	11.1	6.6	1.2	1.7	52.0	12.6	12.6	1.3	0.1	10.2	6.5		
EgDHAsyn1C20EloDom1	pY143-1	11.1	6.5	1.8	1.3	46.0	13.7	16.5	2.4	0.0	12.8	0.0	13.9	0.0
	pY143-2	10.9	6.8	1.1	1.7	52.2	12.5	11.8	2.3	0.0	16.4	0.0		
	pY143-3	11.1	6.0	1.5	1.6	48.4	11.6	16.8	2.4	0.0	12.3	0.0		
EgDHAsyn1C20EloDom2	pY149-1	11.2	6.0	1.1	1.7	51.3	10.3	15.2	2.4	0.0	13.6	0.0	14.3	0.0
	pY149-2	11.0	6.7	1.1	1.8	52.3	12.0	12.5	1.8	0.0	12.6	0.0		
	pY149-3	10.9	6.4	1.1	1.9	52.5	12.3	11.6	2.3	0.0	16.6	0.0		
EgDHAsyn1C20EloDom3-IgD4	pY156-1	11.0	6.9	1.0	1.9	53.6	12.3	11.7	0.7	0.0	5.9	0.0	5.3	0.0
	pY156-2	11.1	5.9	1.1	1.9	52.7	11.5	14.0	0.9	0.0	5.9	0.0		
	pY156-3	11.1	6.1	1.2	1.9	52.4	11.5	14.4	0.6	0.0	4.3	0.0		
EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1	pY157-1	10.9	6.6	1.1	1.8	52.8	12.2	12.2	1.5	0.1	11.8	5.6	12.0	6.3
	pY157-2	10.9	6.5	1.3	1.6	49.1	14.2	13.3	2.0	0.1	13.7	6.9		
	pY157-3	10.9	6.2	1.1	1.8	52.4	11.7	13.6	1.5	0.1	10.6	6.4		
EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4	pY160-1	10.8	5.9	1.2	1.8	51.5	12.0	13.5	2.2	0.2	15.3	9.9	15.2	9.7
	pY160-2	10.8	6.3	1.1	1.8	51.6	12.2	13.2	2.1	0.2	14.9	10.0		
	pY160-3	10.8	6.2	1.1	1.8	52.2	12.4	12.4	2.0	0.2	15.3	9.0		

FIG. 20

Gen	Vector	16:0	16:1	17:1 (9)	18:0	18:1	18:2	EPA	DPA	DHA	% desat. D4	% promedio desat. D4
Vector de control	pGPD	10.3	7.4	1.4	2.0	51.5	22.2	0.6	3.8	0.0	0.0	0.0
EgDHAsyn1	pY141-1	10.5	7.7	1.2	2.2	52.8	21.8	0.4	3.0	0.1	3.1	3.0
	pY141-2	10.2	7.7	1.3	2.0	51.5	22.4	0.4	3.3	0.1	2.8	
	pY141-3	10.4	7.4	2.2	1.9	47.1	23.7	0.5	6.1	0.2	3.0	
IgD4	pY150-1	11.0	7.4	1.7	2.0	49.3	23.1	0.5	4.4	0.0	0.0	0.0
	pY150-2	10.7	8.2	1.9	1.5	47.0	24.8	0.6	4.6	0.0	0.0	
	pY150-3	10.7	7.8	1.4	2.0	49.9	23.0	0.6	3.9	0.0	0.0	
SaD4	pY151-1	10.5	8.7	1.5	1.5	48.1	25.6	0.6	2.8	0.1	2.2	2.5
	pY151-2	10.8	8.0	1.9	1.7	46.1	25.0	0.6	5.3	0.1	2.6	
	pY151-3	10.7	7.8	1.8	1.7	47.0	24.2	0.6	5.3	0.1	2.6	
EgDHAsyn1-D4Dom1	pY152-1	10.7	7.6	1.4	2.1	50.2	22.8	0.6	3.7	0.0	0.0	0.0
	pY152-2	11.0	8.2	2.3	1.5	45.1	26.3	0.6	4.3	0.0	0.0	
	pY152-3	11.0	7.2	1.3	2.4	51.9	21.5	0.5	3.4	0.0	0.0	
EgDHAsyn1-D4Dom2	pY153-1	10.7	8.0	2.1	1.5	46.2	25.7	0.6	4.9	0.1	1.4	1.3
	pY153-2	10.7	7.2	1.6	2.0	49.0	23.3	0.6	5.1	0.1	1.2	
EgDHAsyn1C20EloDom3-IgD4	pY156-1	10.4	7.4	1.2	2.1	52.6	21.6	0.5	3.4	0.0	0.0	0.0
	pY156-2	10.5	7.1	1.3	2.1	51.8	22.1	0.4	3.8	0.0	0.0	
	pY156-3	10.4	7.5	1.3	2.0	52.0	21.3	0.5	4.1	0.0	0.0	
EgDHAsyn1C20EloDom3-EgD4Dom1	pY157-1	10.5	7.4	1.3	2.1	52.2	22.0	0.5	3.2	0.1	3.0	3.2
	pY157-2	10.3	8.2	1.5	1.6	48.5	25.3	0.5	3.4	0.1	3.7	
	pY157-3	10.4	7.3	1.2	2.1	52.3	21.4	0.4	3.7	0.1	2.7	
EgDHAsyn1C20EloDom3-SaD4	pY160-1	10.5	7.2	1.4	2.1	52.0	22.0	0.4	3.3	0.3	7.0	6.2
	pY160-2	10.5	7.6	1.2	2.1	52.2	21.9	0.4	3.1	0.2	5.9	
	pY160-3	10.4	7.6	1.2	2.1	52.2	22.3	0.4	2.8	0.2	5.6	

FIG. 21

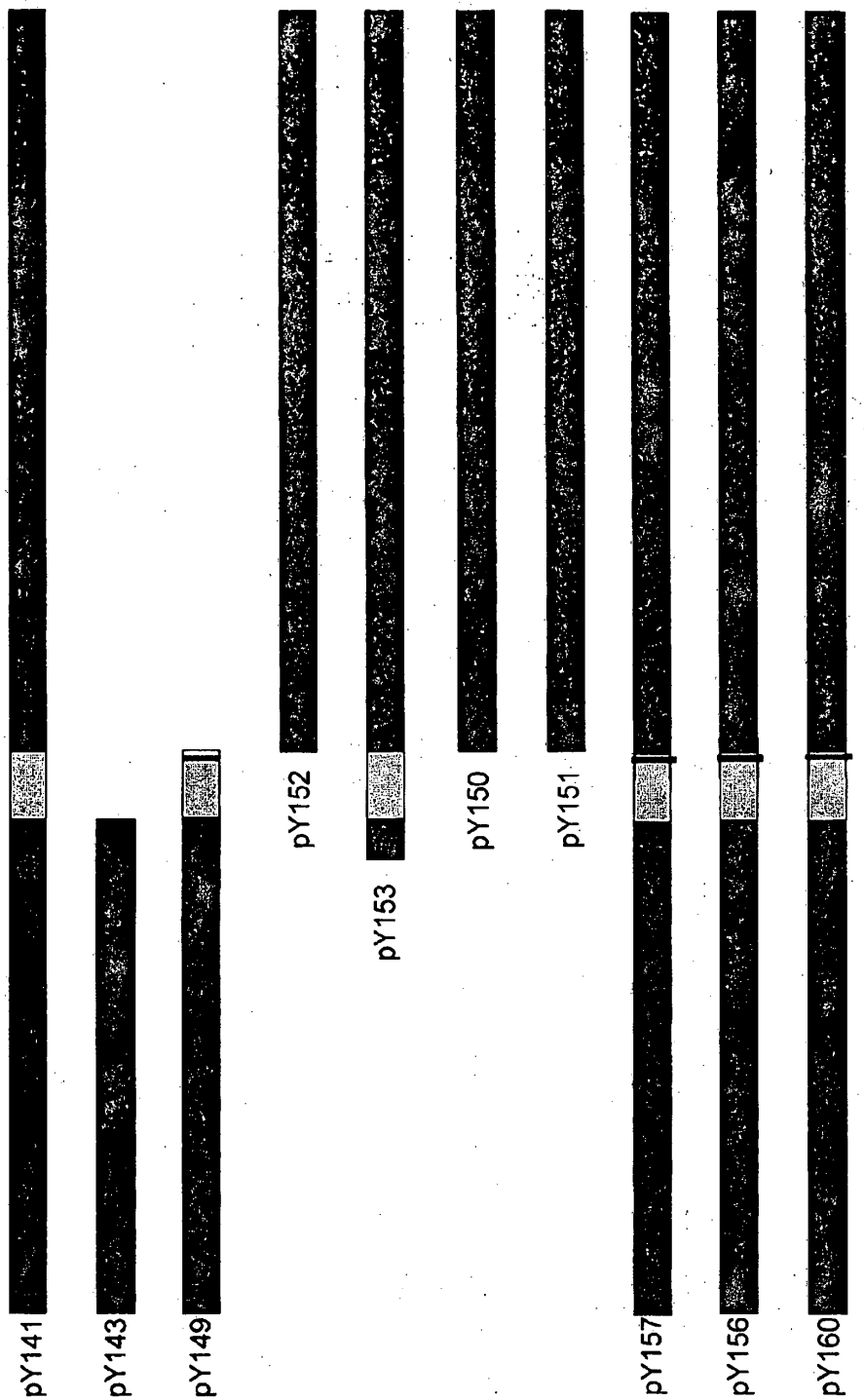

pY141
pY143
pY149
pY152
pY153
pY150
pY151
pY157
pY156
pY160

FIG. 22

Gen	Nombre de la Muestra	Ácido Graso	16:0	16:1(9)	17:1(9)	18:0	18:1	18:2	ARA	EPA	DTA	DPAn-6	DPA	DHA	% elong. C20	% desat. D4	% promed. elong. C20	% promedio desat. D4
Vector de control		EPA	11.5	5.3	1.1	1.7	47.5	16.6	0.1	16.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
EgDHAsyn1	141-1	EPA	11.2	5.4	1.0	1.6	48.0	16.6	0.1	13.6	0.0	0.0	2.3	0.3	15.7	10.0	14.0	11.3
	141-2	EPA	12.4	4.9	1.0	1.7	40.7	17.7	0.1	18.7	0.0	0.0	2.5	0.4	13.5	14.5		
	141-3	EPA	11.7	5.3	0.8	1.7	45.6	16.7	0.1	15.8	0.0	0.0	2.1	0.2	12.9	9.4		
Vector de control		ARA	12.9	4.7	0.8	2.2	42.0	19.7	17.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
EgDHAsyn1	141-1	ARA	12.7	4.7	0.8	2.2	41.8	20.1	15.4	0.0	2.0	0.3	0.0	0.0	12.9	13.0	10.6	15.1
	141-2	ARA	14.5	4.0	0.7	2.6	34.5	20.2	21.2	0.0	1.8	0.4	0.0	0.0	9.2	18.5		
	141-3	ARA	13.6	4.5	0.7	2.3	38.8	20.3	18.0	0.0	1.6	0.3	0.0	0.0	9.6	13.9		
Vector de control		DPA	10.7	6.3	1.1	1.7	46.5	26.7	0.0	1.0	0.0	0.0	6.0	0.0		0.0		
EgDHAsyn1	141-1	DPA	11.2	5.9	1.1	1.9	46.7	26.3	0.0	0.7	0.0	0.0	5.7	0.4		6.4		6.5
	141-2	DPA	11.8	5.8	1.1	1.9	41.0	28.2	0.0	0.7	0.0	0.0	8.8	0.7		7.4		
	141-3	DPA	11.1	6.0	0.9	1.8	44.0	27.8	0.0	0.6	0.0	0.0	7.2	0.5		5.9		

FIG. 23

Nombre de la muestra	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	EDA	DGLA	ARA	ERA	JUN	ETA	EPA	22:3 (10,13,16)	DTA	DPA	DHA	% elong. C20	% desat. D4
AFS4915-5-3-1	11.2	4.3	21.3	20.4	1.0	4.7	4.1	7.6	0.3	3.2	3.7	3.5	7.2	3.1	1.0	1.3	2.1	31.9	61.3
AFS4915-5-3-2	11.8	5.1	37.9	15.9	0.2	6.8	4.4	2.5	0.0	3.5	4.4	0.9	2.1	1.9	0.6	0.7	1.2	46.8	63.4
AFS4915-5-3-3	11.9	5.1	28.6	20.6	0.6	6.8	3.5	4.0	0.1	3.1	3.0	1.9	3.3	3.6	1.1	1.2	1.6	46.8	56.8
AFS4915-5-3-4	14.2	4.2	21.6	33.1	0.5	11.5	1.0	3.7	0.0	0.9	1.1	1.5	2.6	1.7	0.7	0.7	1.2	42.6	64.8
AFS4915-5-3-5	14.9	4.3	18.6	26.3	0.8	8.9	2.5	4.1	0.1	2.5	2.7	2.7	3.9	3.3	1.2	1.7	1.7	46.2	50.0
AFS4915-5-3-6	14.2	4.2	15.2	25.9	0.9	8.9	2.8	5.4	0.1	2.8	3.0	3.5	5.1	3.1	1.1	1.4	2.4	43.3	63.2
AFS4915-5-3-7	14.4	2.1	15.0	26.7	0.9	13.4	1.1	3.1	0.1	2.2	4.7	2.7	9.3	0.6	0.4	1.3	1.7	24.9	56.6
AFS4915-5-3-8	12.0	2.1	19.7	25.9	0.6	10.6	2.5	4.4	0.2	2.6	6.7	1.6	9.8	0.2	0.2	0.3	0.7	8.9	69.8
AFS4915-5-3-9	14.5	3.4	17.5	34.8	0.5	10.3	1.5	5.6	0.1	1.3	1.9	1.9	4.9	0.4	0.3	0.3	0.8	17.7	74.0
AFS4915-5-3-10	13.0	4.0	12.6	23.4	1.0	6.2	2.8	7.8	0.3	2.6	3.1	4.5	8.3	4.4	1.3	1.9	2.8	36.1	59.9
Promedio	13.2	3.9	20.8	25.3	0.7	8.8	2.6	4.8	0.1	2.5	3.4	2.5	5.6	2.2	0.8	1.1	1.6	34.5	62.0

FIG. 24

Nombre de la muestra	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	EDA	DGLA	ERA	ETA	% total elong. D9	% total desat. D8	% promedio elong. D9	% promedio desat. D8
MSE2071-6-9-1	16.7	1.8	4.8	37.8	26.3	0.2	7.5	0.6	4.3	16.4	93.7	16.6	93.5
MSE2071-6-9-2	17.0	1.6	4.8	38.3	23.6	0.2	9.2	0.4	4.8	19.2	95.7		
MSE2071-6-9-3	15.7	2.0	5.4	39.4	26.1	0.3	6.5	0.6	3.9	14.8	91.5		
MSE2071-6-9-4	16.4	1.9	6.0	39.4	23.9	0.2	7.4	0.6	4.1	16.4	93.3		
MSE2071-6-9-5	15.7	1.8	5.5	40.5	24.2	0.3	7.5	0.5	4.0	16.0	93.3		
MSE2071-7-1-1	18.0	2.4	5.7	39.7	29.0	2.8	0.0	2.4	0.0	6.9	0.0	5.8	0.0
MSE2071-7-1-2	15.4	1.8	3.8	41.9	33.1	2.0	0.0	2.0	0.0	5.1	0.0		
MSE2071-7-1-3	16.8	2.0	4.3	39.9	32.4	2.3	0.0	2.4	0.0	6.1	0.0		
MSE2071-7-1-4	16.4	2.2	5.8	41.8	29.2	2.5	0.0	2.2	0.0	6.1	0.0		
MSE2071-7-1-5	16.5	2.2	5.8	42.5	29.3	1.9	0.0	1.7	0.0	4.8	0.0		
MSE2071-7-5-1	15.7	3.0	9.8	41.8	24.0	3.1	0.6	1.9	0.1	8.0	12.1	6.3	16.7
MSE2071-7-5-2	15.7	2.1	6.2	42.9	28.3	2.0	0.9	1.7	0.1	6.2	21.3		
MSE2071-7-5-3	15.8	1.7	5.6	44.4	28.7	1.6	0.7	1.5	0.1	5.1	21.2		
MSE2071-7-5-4	16.9	1.6	5.0	42.3	30.3	1.7	0.6	1.6	0.1	5.1	16.6		
MSE2071-7-5-5	18.2	2.8	5.9	42.0	25.8	2.8	0.7	1.9	0.0	7.3	12.4		
MSE2071-7-15-1	16.4	3.6	10.3	41.4	23.1	3.1	0.1	2.0	0.0	7.5	1.9	6.0	1.3
MSE2071-7-15-2	16.4	3.1	9.3	42.9	23.6	2.9	0.1	1.8	0.0	6.8	1.8		
MSE2071-7-15-3	17.1	1.8	5.3	41.4	31.2	1.6	0.0	1.5	0.0	4.2	0.0		
MSE2071-7-15-4	16.7	2.9	7.7	43.7	25.3	2.2	0.1	1.5	0.0	5.2	1.4		
MSE2071-7-15-5	16.6	3.8	10.0	42.9	22.3	2.7	0.1	1.6	0.0	6.3	1.6		
MSE2071-7-18-1	15.8	2.5	8.9	39.2	19.4	0.4	8.7	0.7	4.3	19.5	92.3	22.1	92.7
MSE2071-7-18-2	17.3	4.3	11.8	34.1	15.3	0.5	11.4	0.7	4.7	25.9	93.3		
MSE2071-7-18-3	17.8	4.1	10.3	34.7	17.8	0.5	9.8	0.9	4.1	22.6	90.9		
MSE2071-7-18-4	16.0	4.2	13.4	35.5	13.5	0.5	11.7	0.6	4.6	26.3	93.4		
MSE2071-7-18-5	15.5	2.0	7.7	41.1	21.4	0.3	7.5	0.5	4.0	16.5	93.4		

ES 2 559 312 T3

FIG. 25

Nombre	Clon Nº	ID de SEC Nº: del inserto completo	ID de SEC Nº: de la CDS	ID de SEC Nº: de AA	Valor E mediante BLASTP	% de Identidad mediante Jotun Hein	% de Identidad mediante Clustal V	Ejemplo Nº
EgC20 elo1	eeg1c.pk005.p14.f	4 (1.327 pb)	5 (897 pb)	6 (298 AA)	6e-62 vs. *Pavlova* C20Elo	45.1% vs. *Pavlova* C20Elo	40.4% vs. *Pavlova* C20Elo	3
EgDHAsyn1	eeg1c.pk016.e6.f	10 (2.630 pb)	11 (2.382 pb)	12 (793 AA)	N-término (~AA 16-268): 5e-61 vs. *Pavlova* C20Elo	47.8% vs. *Pavlova* C20Elo	41.2% vs. *Pavlova* C20Elo	4
					C-término (~AA 253-793):valor E de 0,0 vs. *E.gracilis* D4	98.9% vs. *E. gracilis* D4	98.9% vs. *E.gracilis* D4	
EgDHAsyn2	eeg1c-1	20 (2.630 pb)	21 (2.382 pb)	22 (793 AA)	N-término (~AA 41-268):valor E de 1e-61	48.2% vs. *Pavlova* C20Elo	41.2% vs. *Pavlova* C20Elo	5
					C-término (~AA 253-793): valor E de 0,0	100% vs. *E. gracilis* D4	100% vs. *E.gracilis* D4	

- "*Pavlova* C20Elo" = C20-PUFA Elo a partir de *Pavlova* sp. CCMP459 (ID de SEC Nº: 2) (Nº AAV33630 (GI 54307108) de acceso al NCBI, locus AAV33630, CDS AY630573; Pereira et al., *Biochem. J.* 384:357-366 (2004)
- "*E. gracilis* D4" = delta-4 desaturasa de ácidos grasos de *Eugena gracilis* (ID de SEC Nº: 13) (Nº AAQ19605 (GI 33466346) de acceso al NCBI, locus AAQ19605, CDS AY278558; Meyer et al., *Biochemistry* 42(32):9779-9788 (2003)

FIG. 26

Composición de los ácidos grasos (% en peso)

Caso	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EPA	22:0	DPA	24:0	DHA	24:1	% de elong. C20/delta-5	% de desat. delta-4
5036-2-2	21.4	5.2	16.8	32.1	16.8	2.0	1.9	1.7	1.5	0.7	0.0	54.6	28.0
5036-3-7	22.5	4.5	7.2	38.2	20.8	1.8	1.7	1.1	1.2	0.9	0.0	52.2	44.4
5036-3-8	18.0	4.6	10.3	38.6	21.5	3.3	1.9	0.0	1.4	0.4	0.0	10.6	100.0
5036-7-1	27.8	6.2	11.0	30.0	16.9	2.6	2.7	0.0	1.9	0.8	0.0	24.3	100.0
5036-7-3	21.1	4.1	8.1	38.2	21.0	2.8	1.9	0.5	1.3	1.1	0.0	36.5	71.3
5036-7-4	18.0	4.6	8.0	36.6	25.1	2.4	2.1	0.3	1.6	1.2	0.0	39.1	78.4
5038-1-2	21.2	5.0	8.2	35.9	22.7	1.8	2.4	0.3	1.7	0.9	0.0	40.0	74.2
5038-1-3	21.2	4.2	12.2	35.9	20.2	1.8	1.9	0.5	1.1	1.1	0.0	46.0	68.8
5038-4-1	15.7	3.8	7.9	44.1	24.6	0.9	1.0	0.3	0.8	0.8	0.0	53.3	72.0
5038-1-4	29.6	7.6	9.3	25.6	19.2	1.8	2.4	0.7	1.6	2.2	0.0	62.1	74.9
5038-2-3	18.6	4.2	6.9	40.4	22.0	2.2	2.7	1.1	1.4	0.6	0.0	44.2	34.8
5038-2-7	20.6	4.9	7.5	35.8	23.9	2.0	2.5	0.5	1.6	0.7	0.0	37.4	58.3
5038-2-8	21.8	5.8	8.9	32.1	23.3	2.2	2.9	0.4	2.0	0.6	0.0	31.3	61.5
5038-4-2	19.4	4.5	6.0	35.3	27.4	2.6	2.3	0.0	1.6	1.0	0.0	28.3	100.0
5038-4-4	19.7	5.0	6.9	33.8	27.2	2.3	2.5	0.0	1.8	0.9	0.0	28.4	100.0
5038-4-8	18.1	3.9	5.6	38.5	26.6	2.2	2.6	0.0	1.7	0.9	0.0	28.3	100.0
5038-4-9	18.1	4.3	8.7	39.4	22.0	1.9	2.4	0.7	1.6	1.0	0.0	48.2	57.3
5038-5-3	18.2	4.0	6.8	40.2	23.8	2.0	2.4	0.5	1.5	0.6	0.0	35.6	55.6
5038-5-4	18.3	4.4	7.5	36.4	24.3	2.3	3.1	0.3	1.9	1.5	0.0	44.5	83.0
5038-6-1	17.8	3.4	7.2	42.4	23.3	2.2	1.5	0.3	1.0	1.0	0.0	36.2	77.8
5038-6-2	18.6	4.4	7.3	39.8	22.2	2.9	2.3	0.2	1.5	0.9	0.0	27.4	84.7
5038-7-7	19.0	3.7	8.6	40.8	21.0	2.5	1.7	0.3	1.1	1.3	0.0	39.0	80.2
5035-2-1	17.5	3.5	6.8	36.8	27.7	1.4	2.8	0.7	2.0	0.9	0.0	52.8	54.0
5035-3-1	17.1	3.8	7.5	38.1	25.5	2.7	2.7	0.0	1.8	0.9	0.0	23.8	100.0
5035-3-3	20.0	4.2	7.3	33.7	24.2	1.9	3.7	1.4	2.4	1.2	0.0	57.6	46.7
5035-3-5	17.0	4.0	7.4	35.6	26.8	1.6	3.7	0.5	2.2	1.1	0.0	51.0	70.4
5035-3-6	16.3	3.4	7.9	38.5	25.2	2.2	3.4	0.0	2.1	0.9	0.0	28.1	100.0
5035-6-1	20.0	4.3	5.7	33.6	29.2	2.4	2.0	0.4	1.4	1.1	0.0	38.4	75.8
5035-1-1	26.0	5.2	5.9	29.7	23.9	3.0	2.9	0.0	2.3	1.0	0.0	24.8	100.0
5035-3-8	20.4	4.3	5.6	34.7	27.4	2.3	2.6	0.0	1.6	1.1	0.0	32.3	100.0
5035-3-11	27.3	5.4	6.6	30.6	23.1	1.7	2.2	0.7	1.6	0.9	0.0	48.0	55.6
5035-3-14	20.1	5.3	7.5	34.7	24.8	2.1	2.6	0.5	1.6	0.8	0.0	39.7	60.2
5035-7-3	22.3	4.9	6.1	33.8	25.8	1.1	2.4	0.9	1.6	1.1	0.0	65.2	55.4

FIG. 27

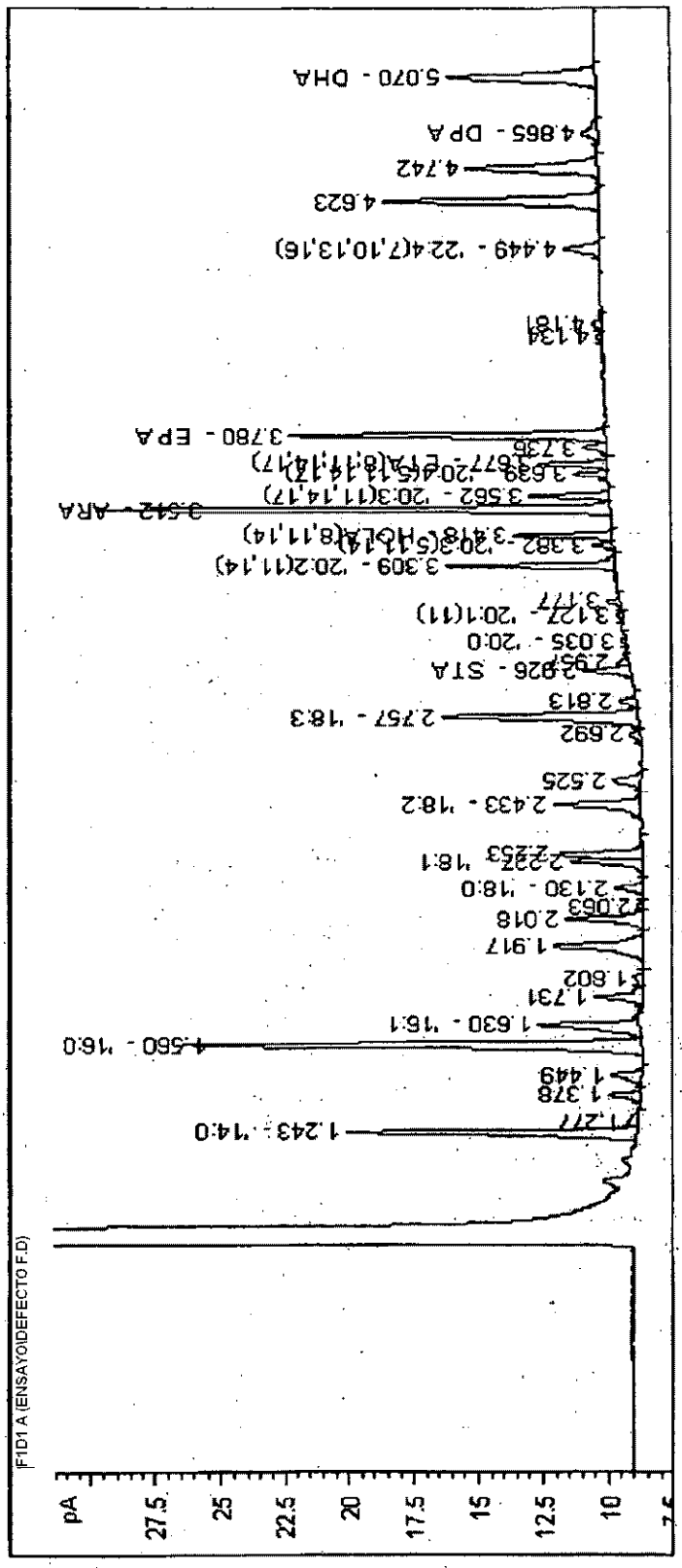

F1D1A (ENSAYO\DEFECTO F.D)
pA
27.5
25
22.5
20
17.5
15
12.5
10
1.243 - 14:0
1.630 - 16:1
4.560 - 16:0
1.917
2.018
2.130 - 18:0
2.433 - 18:2
2.525
2.692
2.757 - 18:3
2.813
2.826 - STA
3.035 - 20:0
3.309 - 20:2(11,14)
3.562 - 20:3(11,14,17)
3.780 - EPA
4.134
4.449 - 22:4(7,10,13,16)
4.623
4.742
4.865 - DPA
5.070 - DHA

FIG. 28

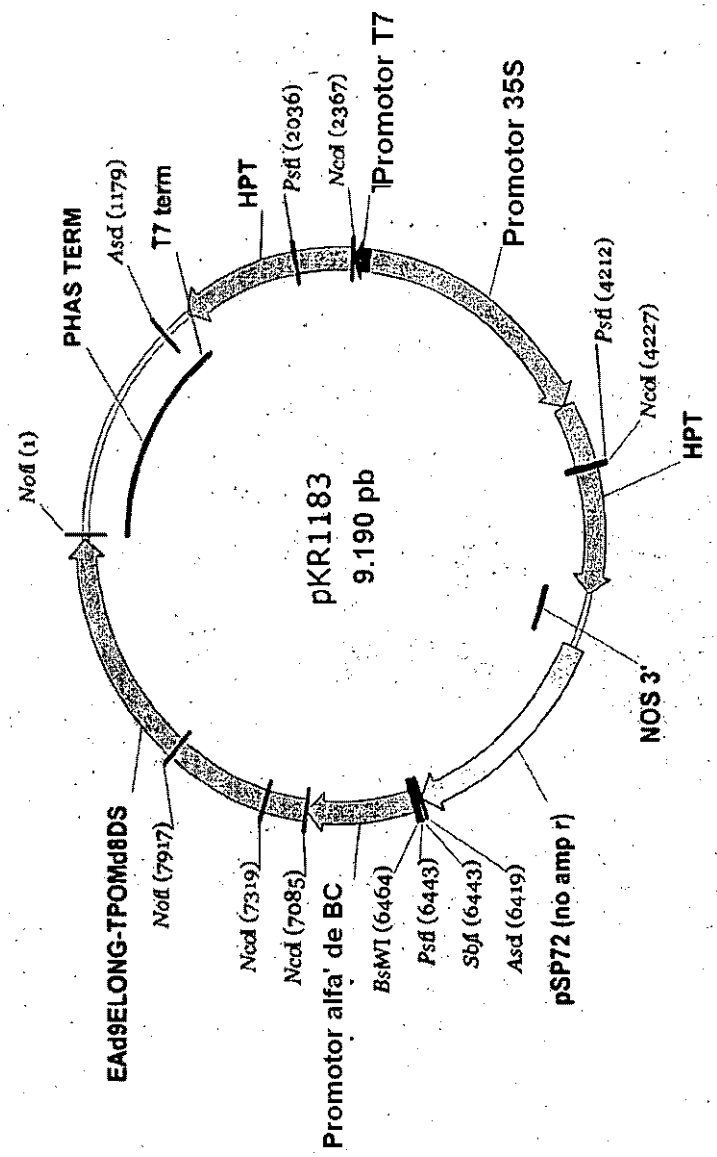

pKR1183
9.190 pb
NotI (1)
PHAS TERM
AsdI (1179)
T7 term
HPT
PstI (2036)
NcoI (2367)
Promotor T7
Promotor 35S
PstI (4212)
NcoI (4227)
HPT
NOS 3'
pSP72 (no amp r)
AsdI (6419)
SbfI (6443)
PstI (6443)
BsiWI (6464)
Promotor alfa' de BC
NcoI (7085)
NcoI (7319)
NotI (7917)
EAd9ELONG-TPOMd8DS

FIG. 29

Dominio	Gen	ID de SEC N°: de nt	ID de SEC N°: de aminoácidos	Observaciones
elongasa C20	EaDHAsyn1	227	231	Dominio EaDHAsyn4 C20 elongasa - La secuencia de aminoácidos es idéntica a la de EaDHAsyn1.
	EaDHAsyn2	228	232	
	EaDHAsyn3	229	233	
	EaDHAsyn4	230	-	
enlazador rico en prolina	EaDHAsyn1	234	235	La secuencia de nt y aminoácidos del enlazador rico en prolina de EaDHAsyn2, EaDHAsyn3 y EaDHAsyn4 son idénticas a la de EaDHAsyn1.
	EaDHAsyn2			
	EaDHAsyn3			
	EaDHAsyn4			
dominio 1 delta-4 desaturasa	EaDHAsyn1	236	239	Dominio delta-4 desaturasa sin enlazador rico en prolina o dominio elongasa C20. La secuencia de nt y aminoácidos para el dominio 1 delta-4 desaturasa de EaDHAsyn3 es idéntica a la de EaDHAsyn1.
	EaDHAsyn2	237	240	
	EaDHAsyn3			
	EaDHAsyn4	238	241	
dominio 2 delta-4 desaturasa	EaDHAsyn1	242	246	Dominio delta-4 desaturasa que incluye enlazador rico en prolina y una región del extremo 3' (C-terminal) del dominio elongasa C20.
	EaDHAsyn2	243	247	
	EaDHAsyn3	244	248	
	EaDHAsyn4	245	249	

FIG. 30

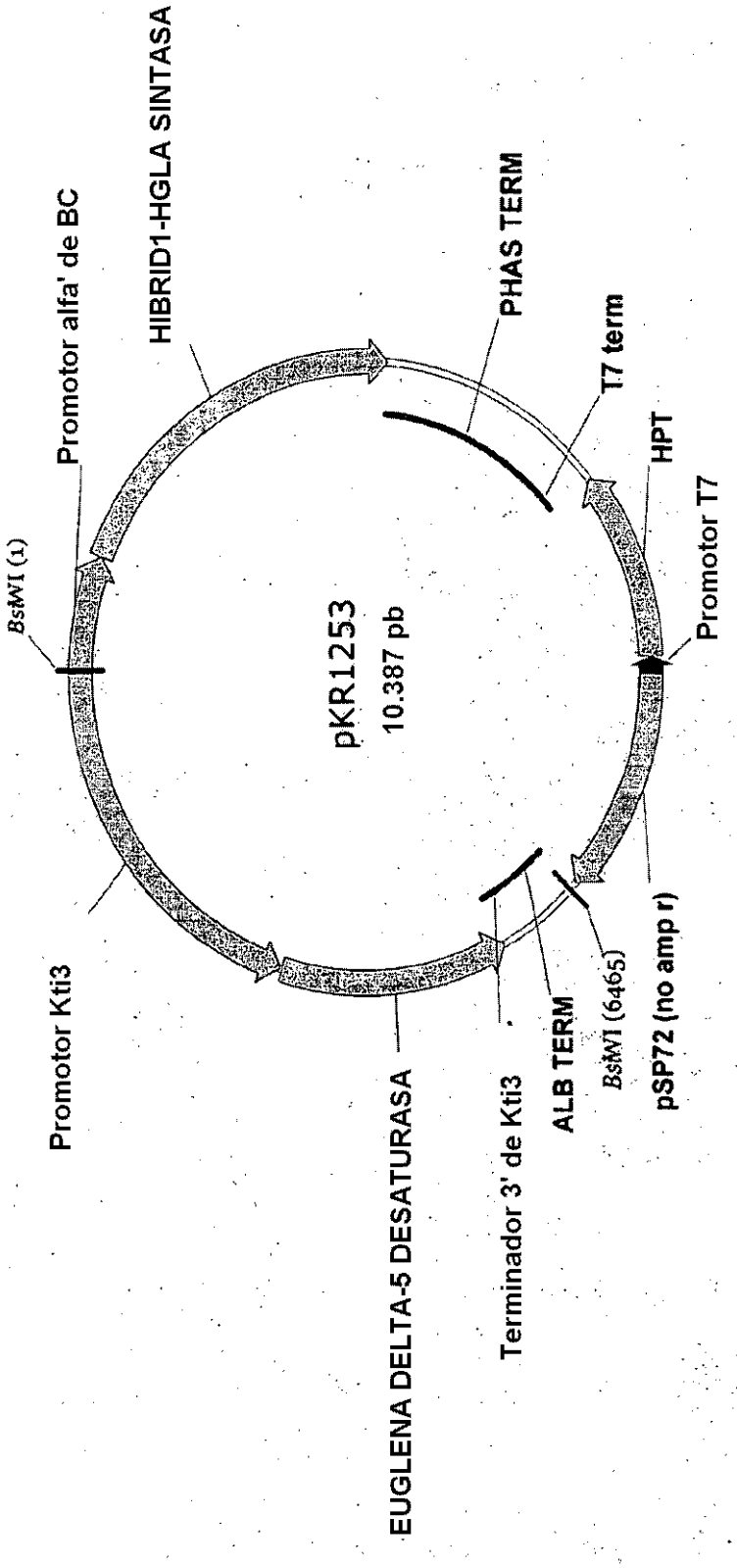

pKR1253
10.387 pb
BsiWI (1)
Promotor alfa' de BC
HIBRID1-HGLA SINTASA
PHAS TERM
T7 term
HPT
Promotor T7
pSP72 (no amp r)
BsiWI (6465)
ALB TERM
Terminador 3' de Kti3
EUGLENA DELTA-5 DESATURASA
Promotor Kti3

FIG. 31

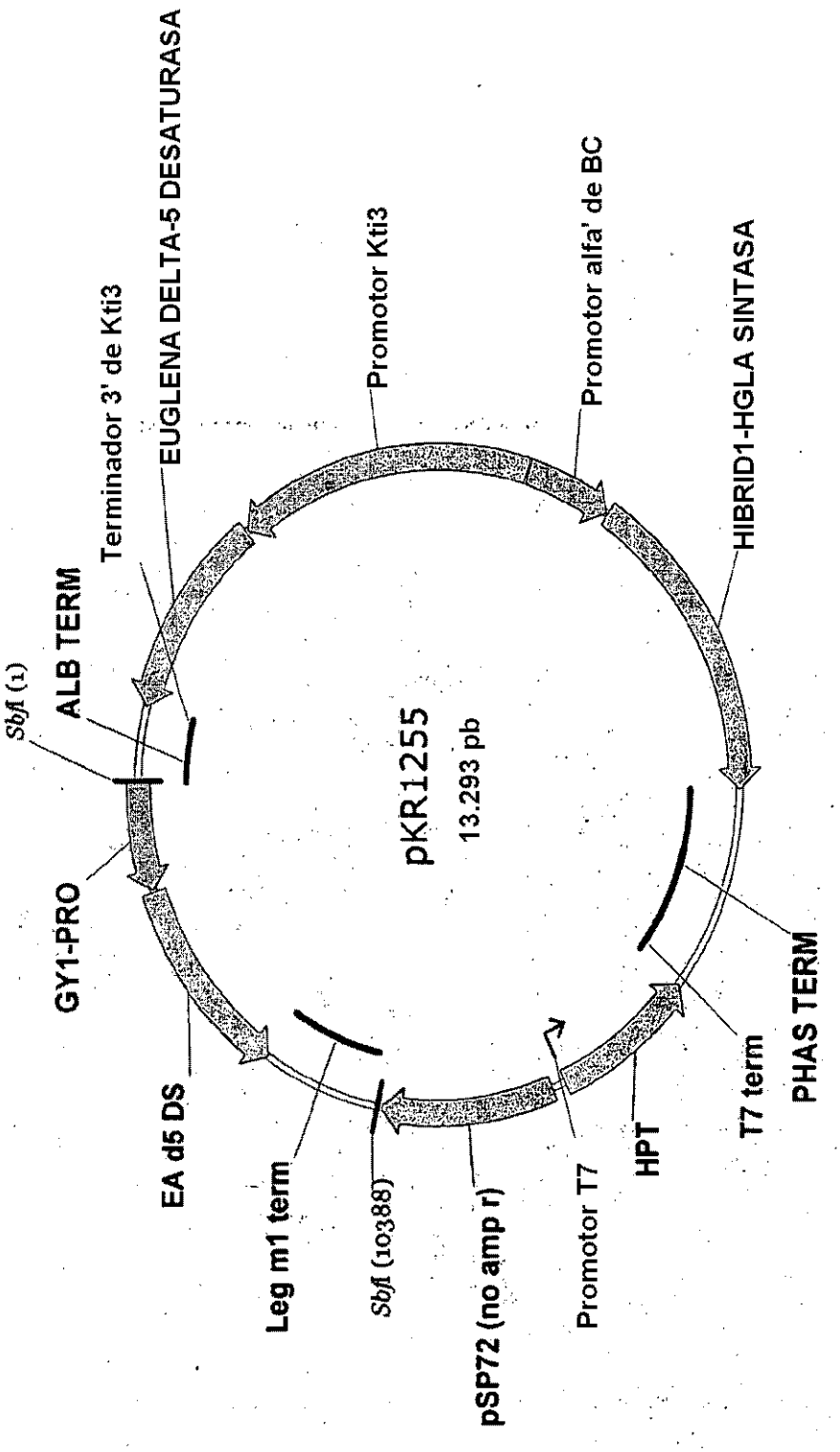

pKR1255
13.293 pb
SbfI (1)
ALB TERM
Terminador 3' de Kti3
EUGLENA DELTA-5 DESATURASA
Promotor Kti3
Promotor alfa' de BC
HIBRID1-HGLA SINTASA
PHAS TERM
T7 term
HPT
Promotor T7
pSP72 (no amp r)
SbfI (10388)
Leg m1 term
EA d5 DS
GY1-PRO

FIG. 32

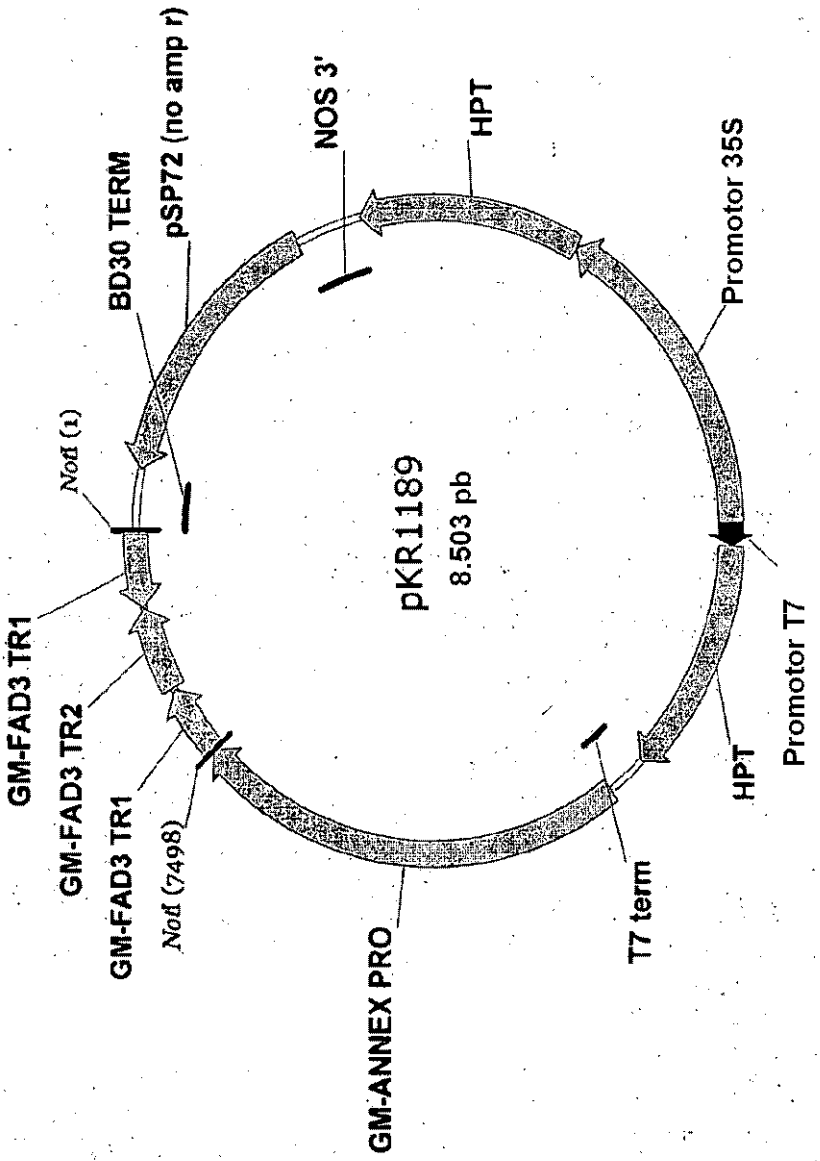

pKR1189
8.503 pb
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
GM-ANNEX PRO
GM-FAD3 TR1
GM-FAD3 TR2
GM-FAD3 TR1
BD30 TERM
pSP72 (no amp r)
NotI (1)
NotI (7498)

FIG. 33

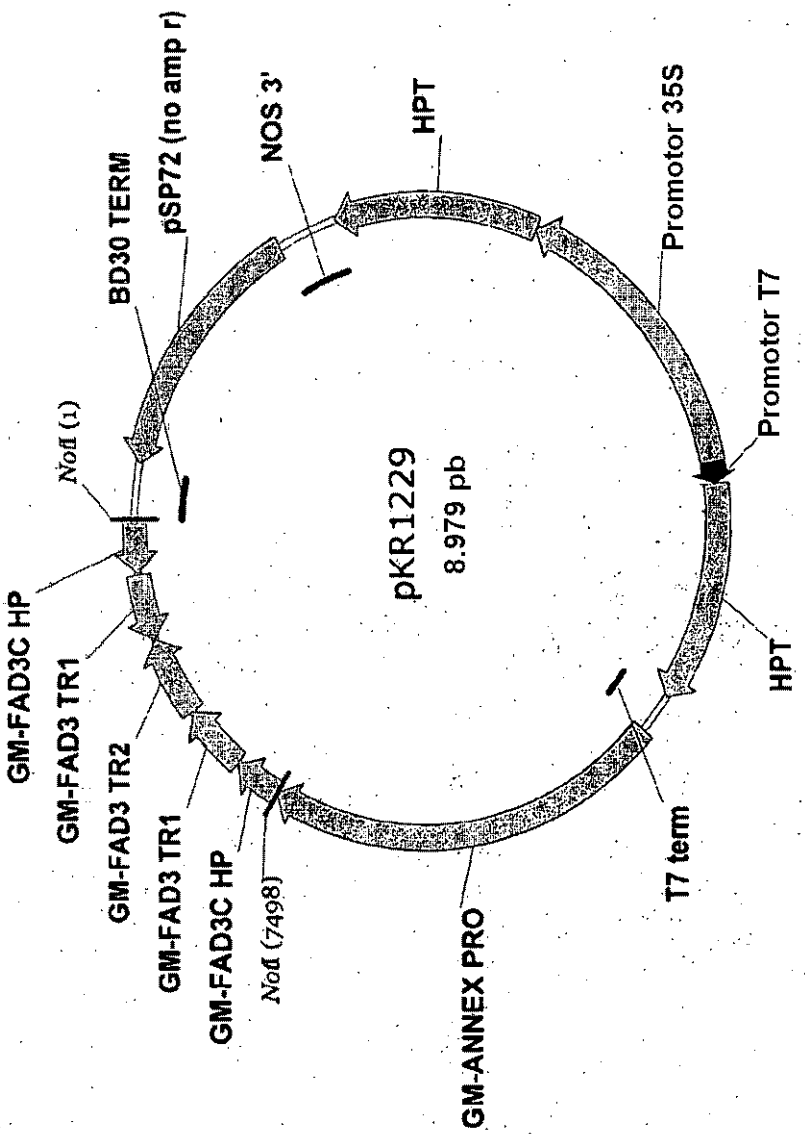

pKR1229
8.979 pb
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
GM-ANNEX PRO
NotI (7498)
GM-FAD3C HP
GM-FAD3 TR1
GM-FAD3 TR2
GM-FAD3 TR1
GM-FAD3C HP
NotI (1)
BD30 TERM
pSP72 (no amp r)
NOS 3'

FIG. 34

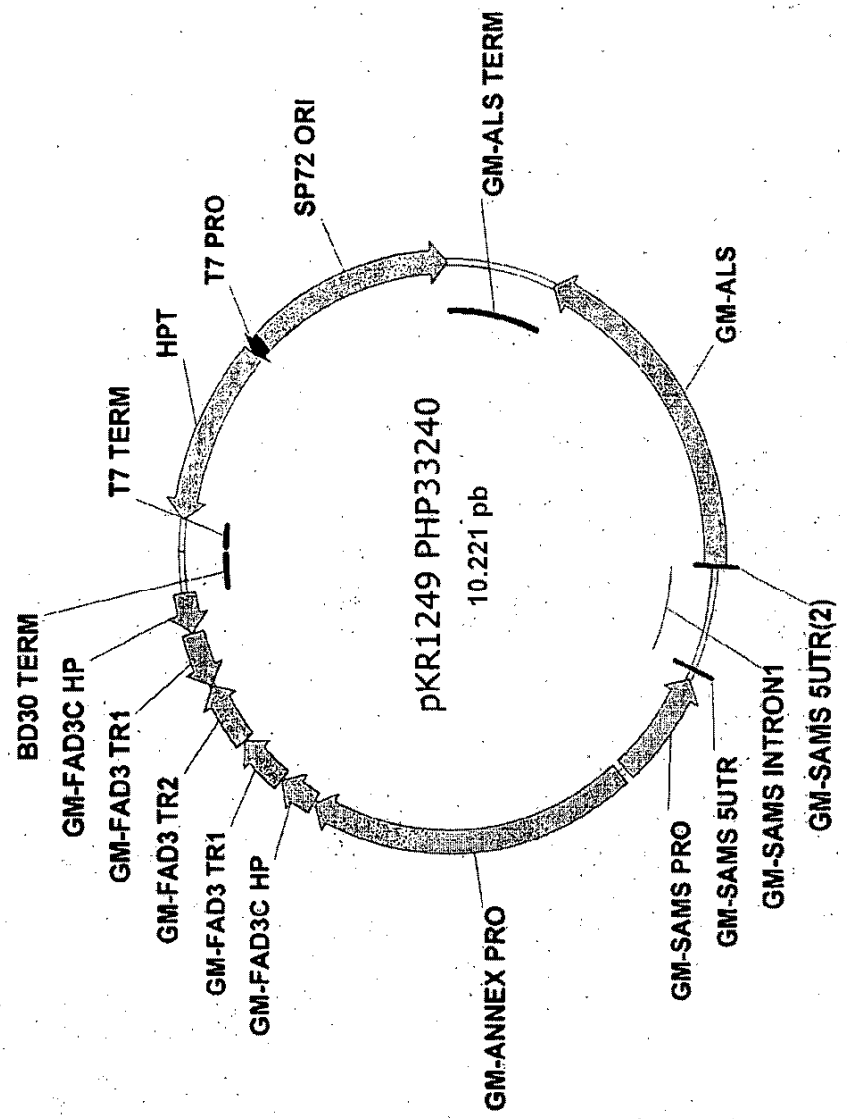

pKR1249 PHP33240
10.221 pb
SP72 ORI
GM-ALS TERM
GM-ALS
GM-SAMS 5UTR(2)
GM-SAMS INTRON1
GM-SAMS 5UTR
GM-SAMS PRO
GM-ANNEX PRO
GM-FAD3C HP
GM-FAD3 TR1
GM-FAD3 TR2
GM-FAD3C HP
GM-FAD3 TR1
BD30 TERM
T7 TERM
HPT
T7 PRO

FIG. 35

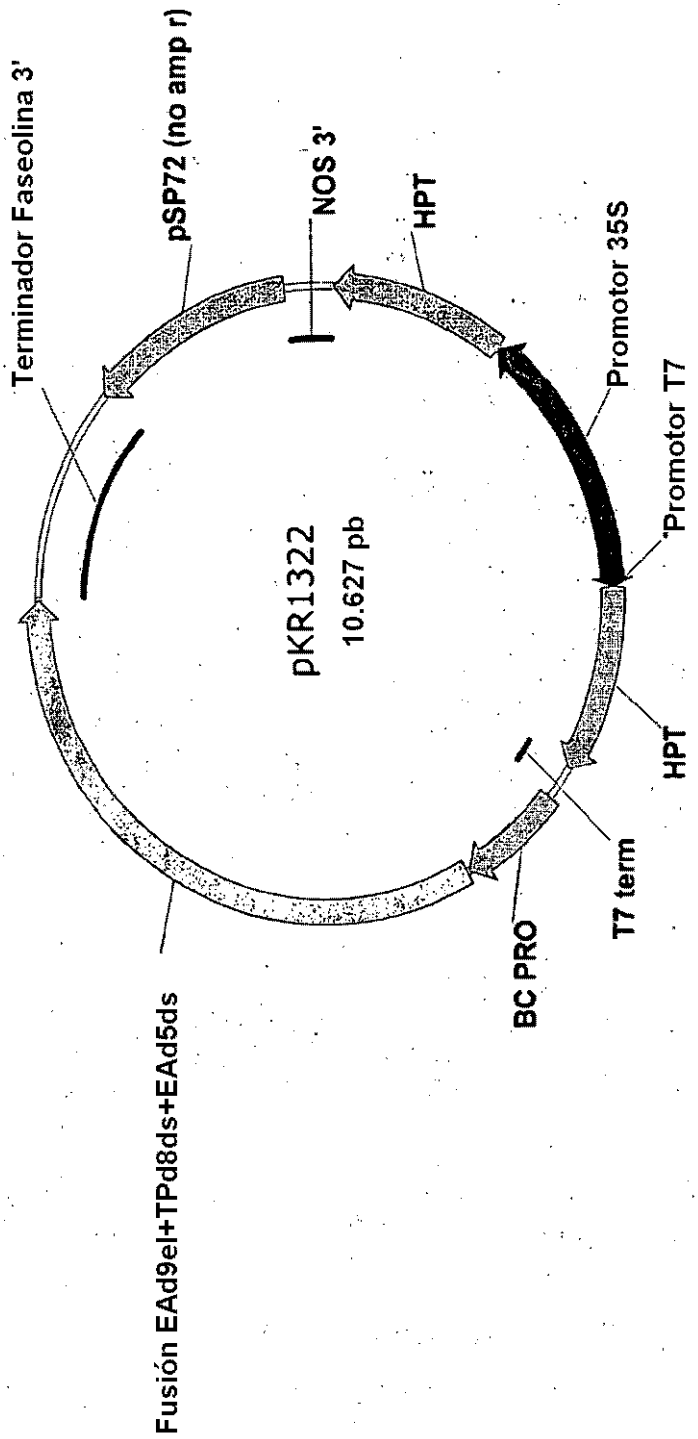

Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
pKR1322
10.627 pb
HPT
T7 term
BC PRO
Fusión EAd9el+TPd8ds+EAd5ds

FIG. 36

Caso Nº	16:0	18:0	18:1	LA	ALA
Típico embrión tipo silvestre	17.5	3.6	6.9	43.5	28.6
2148-4-12-1	15.8	3.6	12.3	53.9	14.4
2148-2-10-1	18.0	3.7	11.5	51.1	15.7
2148-2-5-1	18.8	3.3	8.9	52.8	16.1
2148-4-13-1	16.0	3.7	13.2	50.9	16.2
2148-2-8-1	17.5	3.4	9.6	53.2	16.3
2165-4-1-1	19.4	3.5	9.1	56.0	12.0
2165-1-13-1	18.5	3.4	10.5	55.0	12.6
2165-4-2-1	17.1	3.0	10.0	57.2	12.7
2165-1-5-1	17.3	3.8	11.8	54.0	13.1
2165-1-2-1	18.2	4.3	9.1	54.8	13.6

FIG. 37

Caso Nº	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA
2144-1-3-1	19.1	2.1	7.6	29.9	20.2	1.8	12.2	0.9	6.2
2144-1-3-2	19.7	2.4	6.5	29.6	18.1	2.4	13.8	1.0	6.6
2144-1-3-3	18.9	2.5	7.6	29.4	16.9	4.0	13.4	1.2	6.1
2144-1-3-4	19.2	2.9	6.3	27.4	17.0	5.1	14.2	1.5	6.4
Promedio	19.2	2.5	7.0	29.1	18.0	3.3	13.4	1.1	6.3
2144-1-7-1	18.1	1.9	8.4	33.1	18.1	2.0	12.7	0.6	5.1
2144-1-7-2	18.7	2.2	7.9	32.3	16.8	2.1	13.9	0.7	5.4
2144-1-7-3	18.0	1.7	8.1	34.5	18.4	2.1	11.6	0.6	4.8
2144-1-7-4	18.5	2.0	7.8	33.5	18.2	2.2	12.3	0.8	4.7
Promedio	18.3	1.9	8.1	33.3	17.9	2.1	12.6	0.7	5.0
2144-1-9-1	16.9	2.7	13.4	28.4	10.6	4.0	17.2	0.8	6.0
2144-1-9-2	18.3	2.5	8.9	28.3	16.8	4.3	13.6	1.3	5.9
2144-1-9-3	19.7	2.4	8.7	28.5	19.2	3.9	11.0	1.4	5.2
2144-1-9-4	18.4	1.8	7.5	34.1	21.1	2.4	9.2	0.9	4.6
Promedio	18.3	2.3	9.6	29.8	16.9	3.7	12.7	1.1	5.4
2144-1-10-1	18.2	2.9	9.1	28.7	11.0	7.2	15.8	1.3	5.8
2144-1-10-2	17.8	2.9	9.4	31.6	13.0	7.8	11.7	1.4	4.4
2144-1-10-3	18.2	2.2	8.0	34.1	16.6	3.8	11.3	1.1	4.6
2144-1-10-4	17.9	2.0	6.6	34.9	17.5	3.1	12.1	0.9	4.9
Promedio	18.1	2.5	8.3	32.3	14.5	5.5	12.7	1.2	4.9
2144-2-3-1	18.7	1.8	7.0	30.2	16.4	2.9	16.6	0.8	5.6
2144-2-3-2	17.8	1.5	5.9	30.5	18.0	1.8	16.9	0.6	7.0
2144-2-3-3	16.8	1.2	6.3	29.7	23.0	0.8	14.9	0.3	7.1
2144-2-3-4	17.5	1.7	7.1	31.0	18.1	2.3	15.1	0.7	6.5
Promedio	17.7	1.5	6.6	30.3	18.9	2.0	15.9	0.6	6.5

FIG. 38

	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUN	ETA	EPA	Otros	Total n-3
AFS 5452-7-4	14.3	3.9	10.7	18.4	1.6	9.2	0.4	7.6	29.0	0.4	0.0	0.2	2.1	2.1	4.3
AFS 5452-5-6	16.5	3.1	13.6	17.3	2.2	8.8	3.2	3.8	25.2	0.7	0.7	0.4	2.5	2.1	6.6
AFS 5452-3-8	13.7	3.0	12.7	23.2	1.8	11.0	0.7	5.6	24.0	0.4	0.1	0.2	1.9	1.7	4.5
AFS 5416-8-4	15.3	2.5	18.1	20.3	4.7	3.3	2.6	2.7	23.1	0.4	0.4	0.1	2.9	3.5	8.6
AFS 5450-4-3	14.9	2.9	17.4	21.0	2.9	7.3	0.4	5.7	22.5	0.4	0.2	0.3	1.9	2.2	5.7
AFS 5425-8-2	15.1	2.1	17.2	22.6	8.6	2.7	0.1	3.6	21.6	0.2	0.0	0.3	3.0	2.8	12.2
AFS 5450-1-7	15.1	2.8	18.0	23.5	3.2	6.3	1.2	4.0	21.3	0.3	0.0	0.1	2.2	2.0	5.8
AFS 5450-8-5	15.8	2.8	17.9	18.6	4.4	6.9	1.7	5.3	21.1	0.5	0.1	0.3	2.6	2.0	7.8
AFS 5425-4-2	15.4	2.8	17.4	23.2	5.5	5.1	1.4	2.5	20.8	0.4	0.4	0.1	2.3	2.6	8.7
AFS 5450-1-1	17.3	2.6	15.2	25.3	4.9	5.3	1.6	2.9	20.0	0.4	0.3	0.1	1.7	2.3	7.6
AFS 5450-3-4	15.8	2.5	14.0	25.4	4.1	9.7	2.0	2.4	19.6	0.6	0.4	0.0	2.0	1.3	7.2
AFS 5425-3-4	14.5	3.6	16.1	18.1	4.3	5.7	0.6	10.9	19.6	0.4	0.3	0.8	1.8	3.4	7.5
AFS 5450-5-2	13.9	3.3	22.0	19.0	2.1	8.8	0.3	6.4	19.2	0.5	0.3	0.3	1.4	2.5	4.6
AFS 5425-4-1	14.8	3.0	18.2	22.2	6.4	6.2	0.4	4.3	19.0	0.4	0.0	0.3	2.1	2.7	9.2
AFS 5425-4-3	14.6	2.7	15.4	26.3	9.6	4.6	0.8	2.0	17.9	0.6	0.2	0.1	2.6	2.7	13.2
AFS 5425-8-1	16.2	1.7	14.7	28.4	9.2	2.1	0.1	5.2	17.1	0.2	0.0	0.4	2.2	2.4	12.1
AFS 5416-8-2	14.5	3.7	18.8	22.1	5.4	5.6	1.1	3.8	17.1	0.7	0.6	0.2	3.4	3.1	10.3
AFS 5416-8-1	15.2	2.6	19.2	24.6	4.6	5.2	1.2	4.5	17.0	0.4	0.3	0.6	1.5	2.9	7.5
AFS 5450-2-7	16.0	3.2	18.4	19.9	3.1	6.3	0.8	9.8	16.8	0.3	0.2	0.7	1.6	2.9	5.8
AFS 5450-3-1	14.8	3.7	16.6	21.2	6.6	9.0	1.0	3.0	15.8	1.5	0.6	0.5	4.2	1.6	13.3

FIG. 39

	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUN	ETA	EPA	Otros	Total n-3
AFS 5416-8-1-1	14.7	2.8	18.6	14.6	1.4	9.3	0.8	8.8	21.8	0.8	0.2	0.7	2.4	3.3	5.4
AFS 5416-8-1-2	16.9	1.6	22.5	16.6	3.8	4.4	3.9	1.3	21.5	0.7	1.0	2.8	0.2	2.6	8.6
AFS 5416-8-1-3	14.5	2.2	21.6	15.4	2.1	2.5	0.3	6.9	26.8	0.3	0.1	0.5	2.8	3.9	5.8
AFS 5416-8-1-4	16.0	1.2	11.8	42.1	13.2	1.0	0.8	0.7	8.6	0.2	0.2	1.2	0.2	2.9	15.0
AFS 5416-8-1-5	13.9	3.7	17.8	17.6	1.6	7.7	0.6	6.1	25.5	0.4	0.1	0.3	2.3	2.4	4.7
AFS 5416-8-1-6	17.1	2.3	13.4	41.5	5.6	5.6	1.3	1.7	8.0	0.4	0.4	0.0	1.1	1.6	7.4
AFS 5416-8-1-7	13.4	3.3	16.4	18.2	1.6	6.4	0.5	9.4	25.0	0.3	0.1	0.4	2.0	3.1	4.4
AFS 5416-8-1-8	17.3	2.1	18.6	26.9	9.2	3.5	1.7	2.1	12.6	0.5	0.5	0.2	1.5	3.3	12.0
AFS 5416-8-1-9	13.0	3.7	34.4	18.0	1.7	5.7	0.2	6.3	10.5	0.4	0.1	0.3	1.6	4.0	4.1
AFS 5416-8-1-1	14.8	3.2	17.1	35.4	5.8	5.7	1.9	2.0	9.8	0.4	0.4	0.0	1.3	2.2	7.9
	15.2	2.6	19.2	24.6	4.6	5.2	1.2	4.5	17.0	0.4	0.3	0.6	1.5	2.9	7.5

FIG. 40

	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUN	ETA	EPA	Otros	Total n-3
AFS 5430-6-5	16.5	1.7	12.4	12.0	3.4	1.5	0.1	11.9	29.4	0.1	0.3	0.6	3.6	6.6	7.9
AFS 5430-3-13	12.3	2.0	14.4	24.5	5.5	3.4	2.2	1.4	28.0	0.3	0.1	0.2	2.9	2.9	9.0
AFS 5430-4-7	15.4	2.4	15.3	18.1	4.9	3.3	0.7	4.3	27.6	0.5	0.2	0.4	3.7	3.3	9.6
AFS 5430-7-4	16.5	2.3	14.9	18.4	5.0	3.5	0.2	5.9	25.5	0.3	0.1	1.0	3.2	3.1	9.7
AFS 5430-3-6	14.3	2.9	17.3	17.8	3.0	5.5	0.4	6.3	25.4	0.4	0.1	0.4	2.8	3.4	6.7
AFS 5430-7-5	14.9	3.3	15.3	20.0	4.6	5.5	2.2	2.7	24.9	0.5	0.6	0.2	3.0	2.3	8.9
AFS 5430-4-2	16.2	2.6	16.4	19.2	3.9	4.6	1.1	3.3	24.8	0.5	0.3	0.3	3.3	3.6	8.3
AFS 5430-1-5	13.7	2.8	15.2	22.0	2.5	7.2	0.6	5.7	23.9	0.5	0.2	0.4	2.5	2.9	6.0
AFS 5430-2-7	14.2	2.9	15.0	23.8	4.2	5.8	1.3	3.2	23.8	0.5	0.3	0.2	2.8	2.0	8.0
AFS 5430-7-2	14.8	3.1	21.2	16.1	3.8	4.1	0.8	4.5	23.7	0.4	0.3	0.4	3.6	3.2	8.5
AFS 5430-3-1	14.8	3.0	19.9	17.5	3.0	6.0	0.8	4.8	23.2	0.4	0.2	0.3	2.6	3.3	6.6
AFS 5430-6-2	15.8	2.7	14.4	23.4	4.6	6.5	0.7	4.0	22.8	0.4	0.2	0.3	2.3	2.0	7.7
AFS 5430-3-3	13.8	2.6	18.0	21.1	4.1	4.6	0.5	7.0	22.6	0.2	0.1	0.2	1.5	3.7	6.2
AFS 5430-1-9	14.0	3.0	19.9	18.7	4.5	5.2	0.5	5.0	22.5	0.4	0.1	0.3	2.7	3.1	8.0
AFS 5430-1-2	15.3	2.7	14.7	22.0	4.8	6.3	0.6	4.1	22.5	0.6	0.2	0.4	2.9	3.0	8.9
AFS 5430-1-11	14.8	2.7	18.1	19.4	2.2	6.5	0.5	6.8	22.4	0.5	0.2	0.4	2.3	3.2	5.6
AFS 5430-4-4	15.2	2.5	16.1	20.4	2.9	9.1	0.7	4.5	22.2	0.7	0.2	0.4	3.1	2.1	7.3
AFS 5430-1-17	15.5	2.6	14.2	22.5	6.1	3.8	1.2	2.2	21.8	0.6	0.4	0.2	3.5	5.5	10.8
AFS 5430-3-14	14.9	3.0	16.4	20.8	5.6	4.6	2.0	3.1	21.6	0.6	0.5	0.3	3.7	3.0	10.8
AFS 5430-2-1	13.4	3.7	21.7	14.3	3.6	5.9	1.0	5.7	21.0	0.8	0.4	0.5	4.5	3.6	9.8

ES 2 559 312 T3

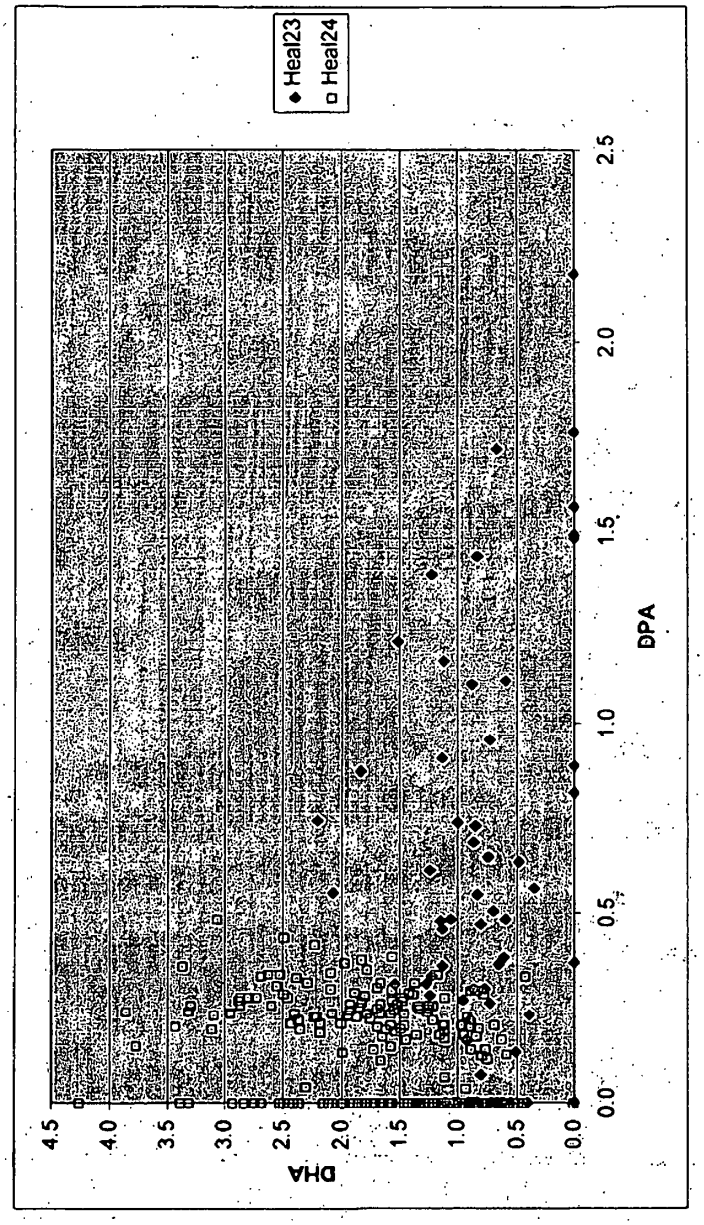
FIG. 41

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)											% de elong. C20/delta-5	% de desat. delta-4
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EPA	22:0	DPA	24:0	DHA	24:1		
5112-1-1	31.0	6.9	11.2	25.6	14.9	2.7	3.4	0.2	1.7	2.4	0.0	49.2	91.9
5112-1-2	24.0	5.7	10.1	32.2	17.4	2.5	3.6	0.2	2.4	1.9	0.0	45.2	89.1
5112-5-5	27.9	5.8	9.6	28.9	16.6	2.9	3.9	0.2	2.1	2.2	0.0	46.1	90.7
5113-1-2	29.6	6.7	10.8	22.4	19.2	3.2	3.1	0.3	2.0	2.5	0.0	47.1	88.0
5113-1-6	27.6	6.5	11.0	24.5	17.4	3.2	4.2	0.3	2.1	3.3	0.0	52.7	92.6
5113-1-8	33.0	7.8	15.8	21.4	10.7	2.5	3.1	0.2	1.7	3.9	0.0	62.4	94.1
5113-3-1	33.1	8.4	16.1	19.0	11.2	2.9	3.4	0.1	2.0	3.8	0.0	57.7	96.2
5113-3-2	26.1	6.6	13.4	28.1	14.9	3.0	3.1	0.3	1.7	2.7	0.0	49.7	90.6
5113-3-3	32.5	7.6	12.5	21.4	14.9	2.4	3.4	0.3	2.1	2.9	0.0	56.2	91.7
5113-4-3	27.8	6.3	13.2	24.6	16.4	2.8	3.2	0.2	2.1	3.3	0.0	55.5	93.2
5113-4-4	23.9	6.0	12.5	28.0	18.1	3.3	3.0	0.3	2.0	2.9	0.0	49.0	91.4
5113-4-5	27.5	5.4	16.2	26.5	14.7	2.6	2.4	0.2	1.2	3.1	0.0	56.4	93.0
5113-4-9	28.0	6.2	8.6	28.3	18.5	2.7	2.8	0.3	1.8	2.8	0.0	53.0	90.8
5113-4-13	27.6	6.4	9.8	29.6	16.5	2.6	2.5	0.3	2.1	2.6	0.0	53.0	88.5
5113-5-1	27.1	6.4	9.6	25.8	19.1	2.9	3.6	0.2	2.3	2.9	0.0	52.6	92.6
5113-6-1	31.3	6.7	9.0	23.7	19.0	2.6	3.0	0.3	1.9	2.5	0.0	52.5	89.1
5113-6-3	28.7	7.1	9.0	26.7	17.8	2.4	3.0	0.2	2.0	3.1	0.0	57.9	94.1
5113-6-5	27.7	6.3	12.7	26.0	16.7	2.1	2.8	0.2	2.0	3.4	0.0	63.5	94.4
5113-6-7	27.9	5.4	9.2	30.5	18.7	2.1	2.2	0.3	1.4	2.4	0.0	56.6	87.7
5113-6-8	28.2	6.3	9.4	26.5	18.8	2.8	3.2	0.3	2.1	2.5	0.0	49.7	89.7
5113-7-7	28.5	6.3	9.6	25.0	18.5	2.3	3.7	0.4	2.3	3.4	0.0	62.1	90.2
5113-7-9	26.4	6.3	8.8	28.7	19.6	2.3	3.1	0.3	1.9	2.6	0.0	54.9	90.9
5113-7-10	30.7	6.2	8.5	24.2	18.9	2.7	3.0	0.5	2.2	3.1	0.0	56.5	86.4
5116-1-3	29.1	6.1	8.0	28.5	19.2	1.6	2.6	0.3	1.8	2.7	0.0	64.7	88.8
5116-4-2	29.2	6.0	8.2	28.7	19.7	1.9	2.2	0.3	1.5	2.3	0.0	58.1	87.8
5116-5-1	29.4	6.4	10.7	29.8	16.5	1.2	2.5	0.3	1.4	1.8	0.0	63.4	87.9
5116-6-3	24.7	5.7	9.0	33.7	19.8	1.5	2.0	0.3	1.4	1.9	0.0	59.2	86.5
5111-2-1	35.1	7.7	9.4	18.5	13.9	2.5	6.1	0.0	4.1	2.7	0.0	52.1	100.0
5111-3-1	32.4	7.2	14.3	19.0	12.9	2.0	4.8	0.0	3.1	4.3	0.0	68.6	100.0
5111-3-2	28.4	6.7	14.9	23.0	14.4	2.1	4.5	0.0	3.0	2.9	0.0	58.1	100.0
5111-3-3	33.1	7.6	17.0	19.0	11.2	2.5	4.3	0.0	2.0	3.4	0.0	57.9	100.0
5111-3-4	36.1	7.6	18.4	17.1	10.4	2.4	3.2	0.0	1.9	2.8	0.0	53.8	100.0
5111-3-6	30.7	7.4	13.2	21.6	15.2	2.1	4.1	0.0	2.3	3.3	0.0	61.6	100.0
5111-3-7	33.8	6.0	12.0	23.3	14.8	2.5	3.2	0.0	1.8	2.7	0.0	51.8	100.0
'5111-7-2	31.6	6.8	11.6	23.8	16.3	2.2	3.2	0.0	1.9	2.7	0.0	55.8	100.0
'5112-2-6	23.3	4.9	18.9	27.2	18.1	1.6	2.0	0.0	1.5	2.5	0.0	60.4	100.0
'5111-2-3	33.2	7.5	13.5	24.3	13.5	0.9	3.1	0.0	2.0	2.0	0.0	67.8	100.0
'5111-3-9	21.1	6.1	14.7	34.1	18.7	1.0	1.2	0.2	0.8	2.1	0.0	69.7	89.8
'5111-3-11	29.3	8.9	19.6	21.8	12.7	0.6	3.0	0.2	1.7	2.2	0.0	79.6	92.1
'5111-3-14	24.9	6.4	12.1	30.3	19.4	1.3	2.3	0.0	1.7	1.7	0.0	56.6	100.0
'5111-4-12	30.7	7.0	17.4	22.1	15.2	1.3	2.0	0.3	1.2	2.9	0.0	70.2	91.1
'5111-4-13	26.3	5.1	10.1	32.6	18.7	1.2	2.5	0.3	1.5	1.8	0.0	63.9	86.3
'5111-5-4	25.9	6.0	9.6	32.8	18.7	1.1	2.5	0.3	1.7	1.6	0.0	62.7	84.9
'5111-5-8	31.1	7.0	10.8	27.9	15.4	1.2	2.5	0.4	1.9	1.8	0.0	64.9	82.8

FIG. 42

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)											% de elong. C20/delta-5	% de desat. delta-4
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EPA	22:0	DPA	24:0	DHA	24:1		
5037-5-8	30.0	6.5	9.3	25.2	18.6	3.9	3.1	0.0	2.4	0.9	0.0	18.9	100.0
5037-3-2	16.0	4.6	7.2	35.5	27.0	2.2	3.7	0.3	2.4	1.2	0.0	41.3	81.3
5037-3-4	15.9	4.5	8.7	36.0	25.5	2.2	3.6	0.2	2.6	0.9	0.0	34.0	80.2
5037-3-8	22.5	4.5	12.7	32.6	18.4	2.6	2.1	0.6	1.4	2.1	0.6	50.7	78.9
5037-5-12	20.9	4.3	12.7	33.7	20.2	2.3	1.8	0.9	1.3	1.8	0.0	53.8	67.9
5037-5-9	40.9	8.3	10.4	18.3	13.3	1.4	3.0	0.6	2.5	1.2	0.0	57.4	66.8
5037-5-11	26.1	5.3	10.1	29.5	18.3	1.9	3.7	1.2	2.4	1.5	0.0	59.4	55.5
5037-5-7	16.0	4.6	8.5	40.4	22.0	2.8	1.9	1.2	1.3	1.1	0.2	44.8	48.9

FIG. 43



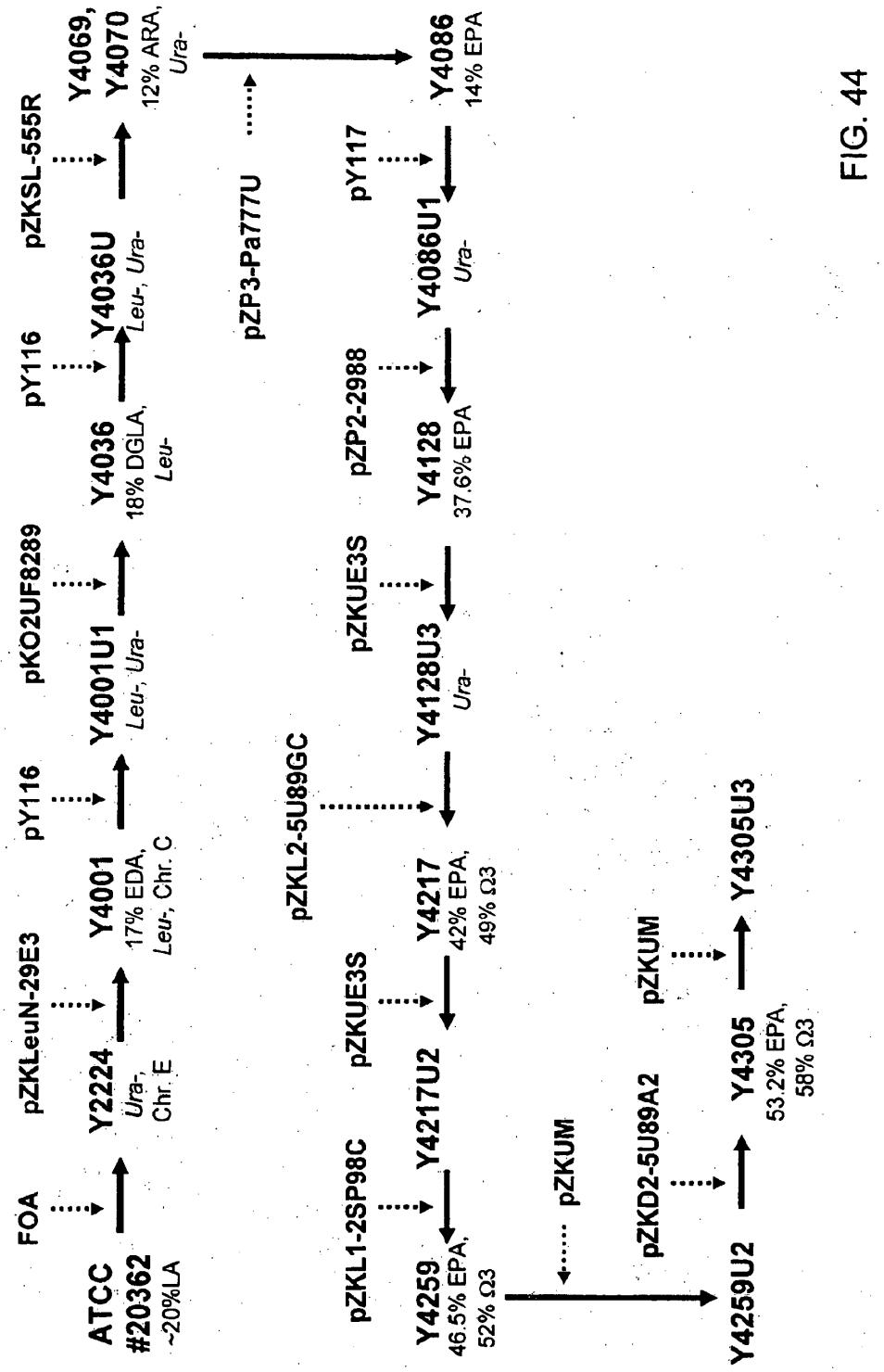

ATCC #20362 ~20%LA
FOA
Y2224 Ura-, Chr. E
pZKLeuN-29E3
Y4001 17% EDA, Leu-, Chr. C
pY116
Y4001U1 Leu-, Ura-
pKO2UF8289
Y4036 18% DGLA, Leu-
pY116
Y4036U Leu-, Ura-
pZKSL-555R
Y4069, Y4070 12% ARA, Ura-
pZP3-Pa777U
pZKL2-5U89GC
pZKL1-2SP98C
Y4259 46.5% EPA, 52% Ω3
pZKUE3S
Y4217U2
Y4217 42% EPA, 49% Ω3
pZKUE3S
Y4128U3 Ura-
pZP2-2988
Y4128 37.6% EPA
pY117
Y4086U1 Ura-
Y4086 14% EPA
pZKUM
pZKD2-5U89A2
Y4259U2
pZKUM
Y4305
Y4305U3
53.2% EPA, 58% Ω3

FIG. 44

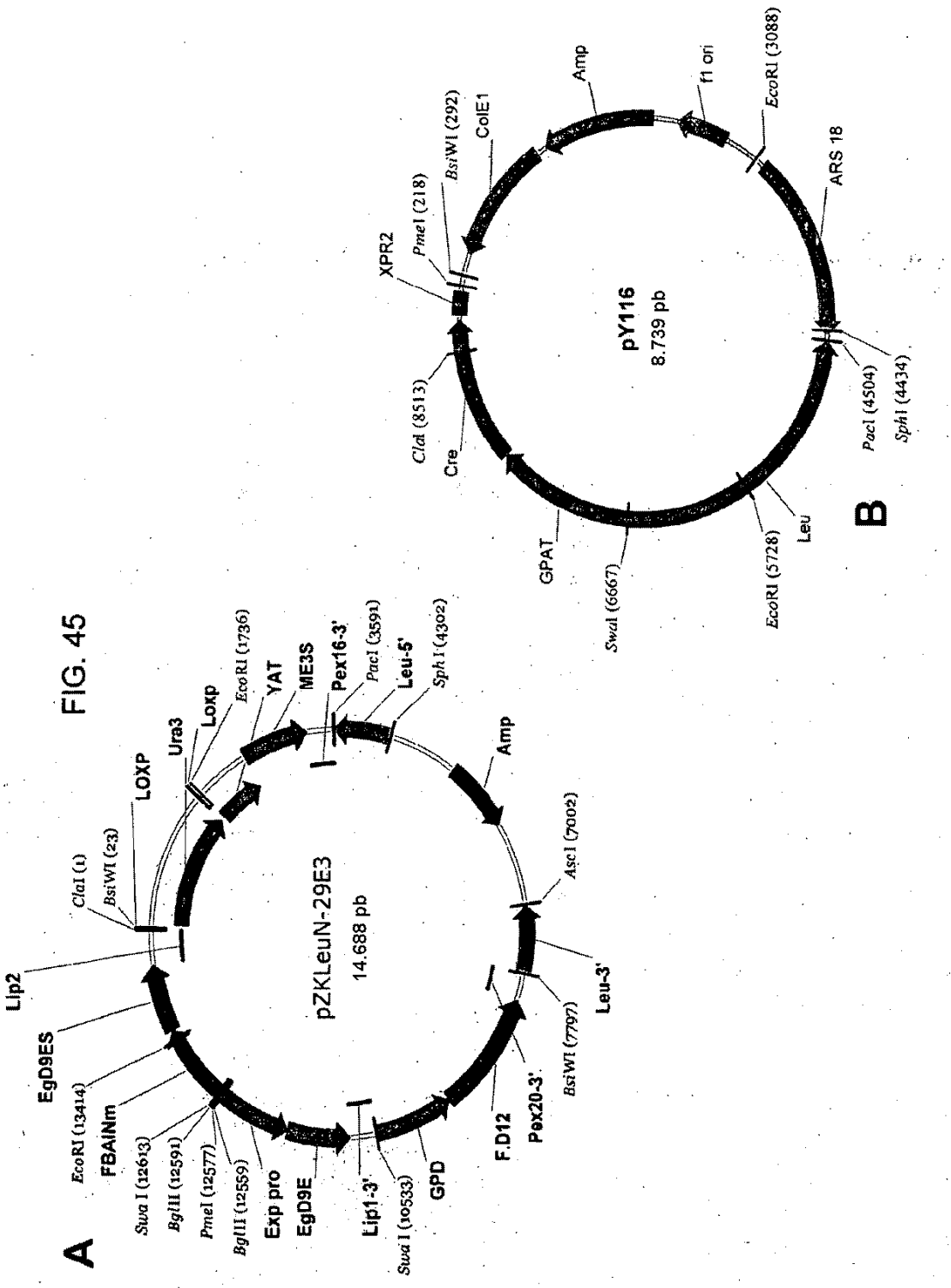

A
pZKLeuN-29E3
14.688 pb
Lip2
EgD9ES
EcoRI (13414)
FBAINm
Swa I (12613)
BglII (12591)
PmeI (12577)
BglII (12559)
Exp pro
EgD9E
Lip1-3'
Swa I (10533)
GPD
F.D12
Pex20-3'
BsiWI (7797)
Leu-3'
AscI (7002)
Amp
Sph I (4302)
Leu-5'
PacI (3591)
Pex16-3'
ME3S
YAT
EcoRI (1736)
Loxp
Ura3
LOXP
BsiWI (23)
ClaI (1)
B
pY116
8.739 pb
XPR2
PmeI (218)
BsiWI (292)
ColE1
Amp
f1 ori
EcoRI (3088)
ARS 18
PacI (4504)
SphI (4434)
Leu
EcoRI (5728)
SwaI (6667)
GPAT
Cre
ClaI (8513)

FIG. 45

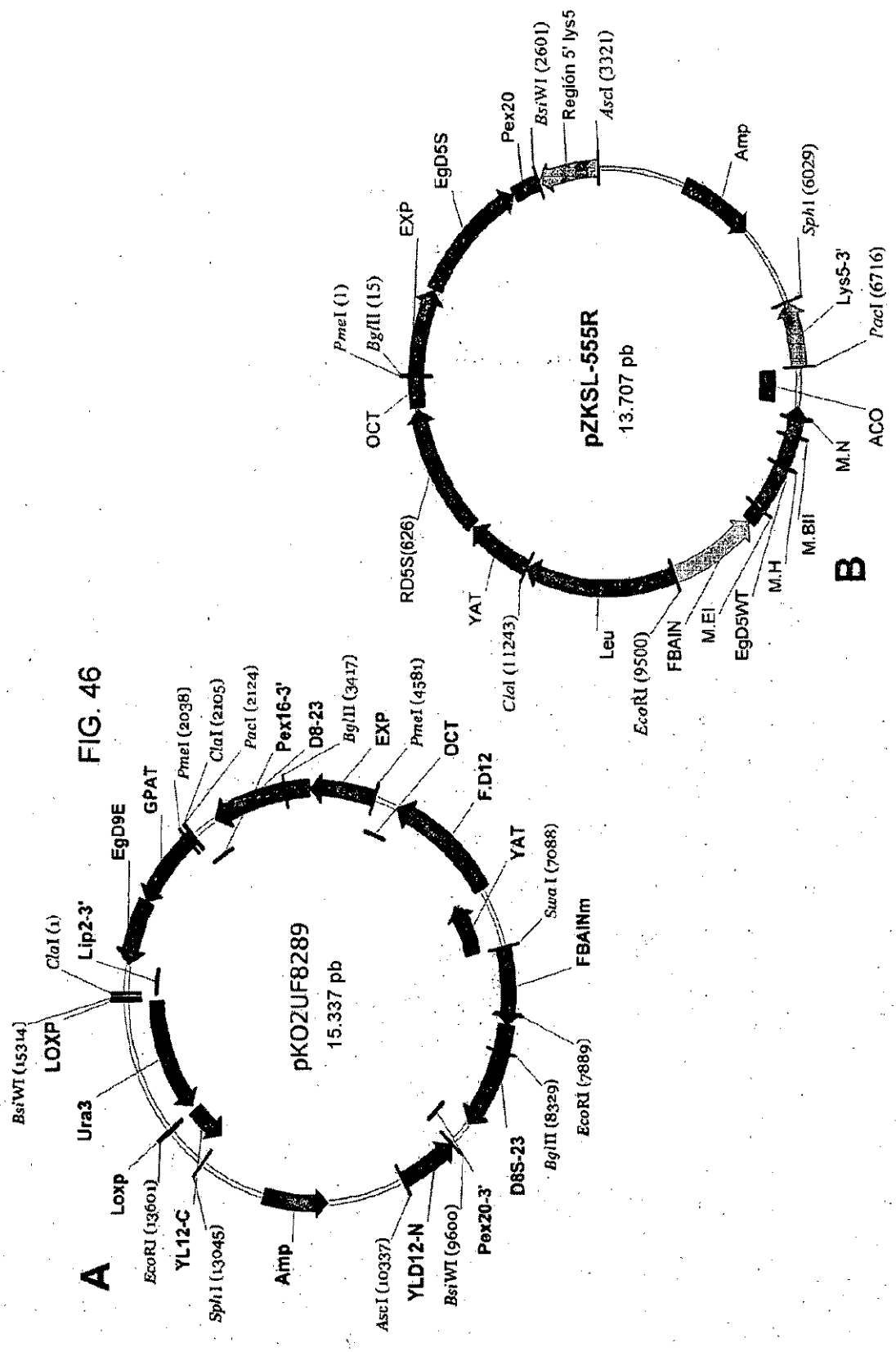

A
pKO2UF8289
15.337 pb
BsiWI (15314)
LOXP
ClaI (1)
Lip2-3'
EgD9E
GPAT
PmeI (2038)
ClaI (2105)
PacI (2124)
Pex16-3'
D8-23
BglII (3417)
EXP
PmeI (4581)
OCT
F.D12
YAT
SwaI (7088)
FBAINm
EcoRI (7889)
BglII (8329)
D8S-23
Pex20-3'
BsiWI (9600)
YLD12-N
AscI (10337)
Amp
SphI (13045)
YL12-C
EcoRI (13601)
Loxp
Ura3
B
pZKSL-555R
13.707 pb
PmeI (1)
BglII (15)
OCT
EXP
EgD5S
Pex20
BsiWI (2601)
Región 5' lys5
AscI (3321)
Amp
SphI (6029)
Lys5-3'
PacI (6716)
ACO
M.N
M.BII
M.H
EgD5WT
M.EI
FBAIN
EcoRI (9500)
Leu
ClaI (11243)
YAT
RD5S(626)

FIG. 46

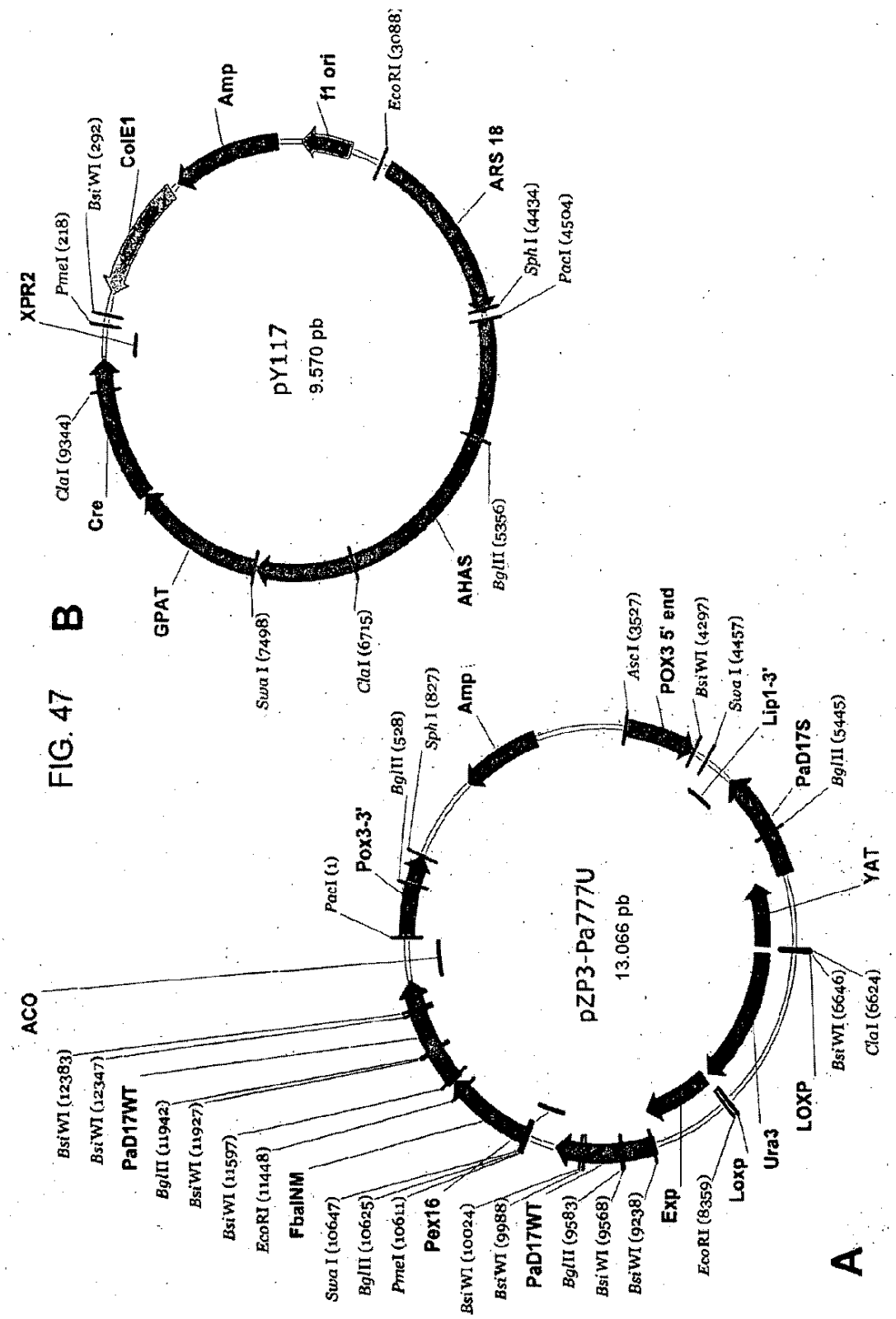


FIG. 47
B
pY117
9.570 pb
XPR2
PmeI (218)
BsiWI (292)
ColE1
Amp
f1 ori
EcoRI (3088)
ARS 18
SphI (4434)
PacI (4504)
AHAS
BglII (5356)
ClaI (6715)
SwaI (7498)
GPAT
Cre
ClaI (9344)
A
pZP3-Pa777U
13.066 pb
ACO
BsiWI (12383)
BsiWI (12347)
PaD17WT
BglII (11942)
BsiWI (11927)
BsiWI (11597)
EcoRI (11448)
FbaINM
SwaI (10647)
BglII (10625)
PmeI (10611)
Pex16
BsiWI (10024)
BsiWI (9988)
PaD17WT
BglII (9583)
BsiWI (9568)
BsiWI (9238)
Exp
EcoRI (8359)
Loxp
Ura3
LOXP
BsiWI (6646)
ClaI (6624)
YAT
PaD17S
BglII (5445)
Lip1-3'
SwaI (4457)
BsiWI (4297)
POX3 5' end
AscI (3527)
Amp
SphI (827)
BglII (528)
Pox3-3'
PacI (1)

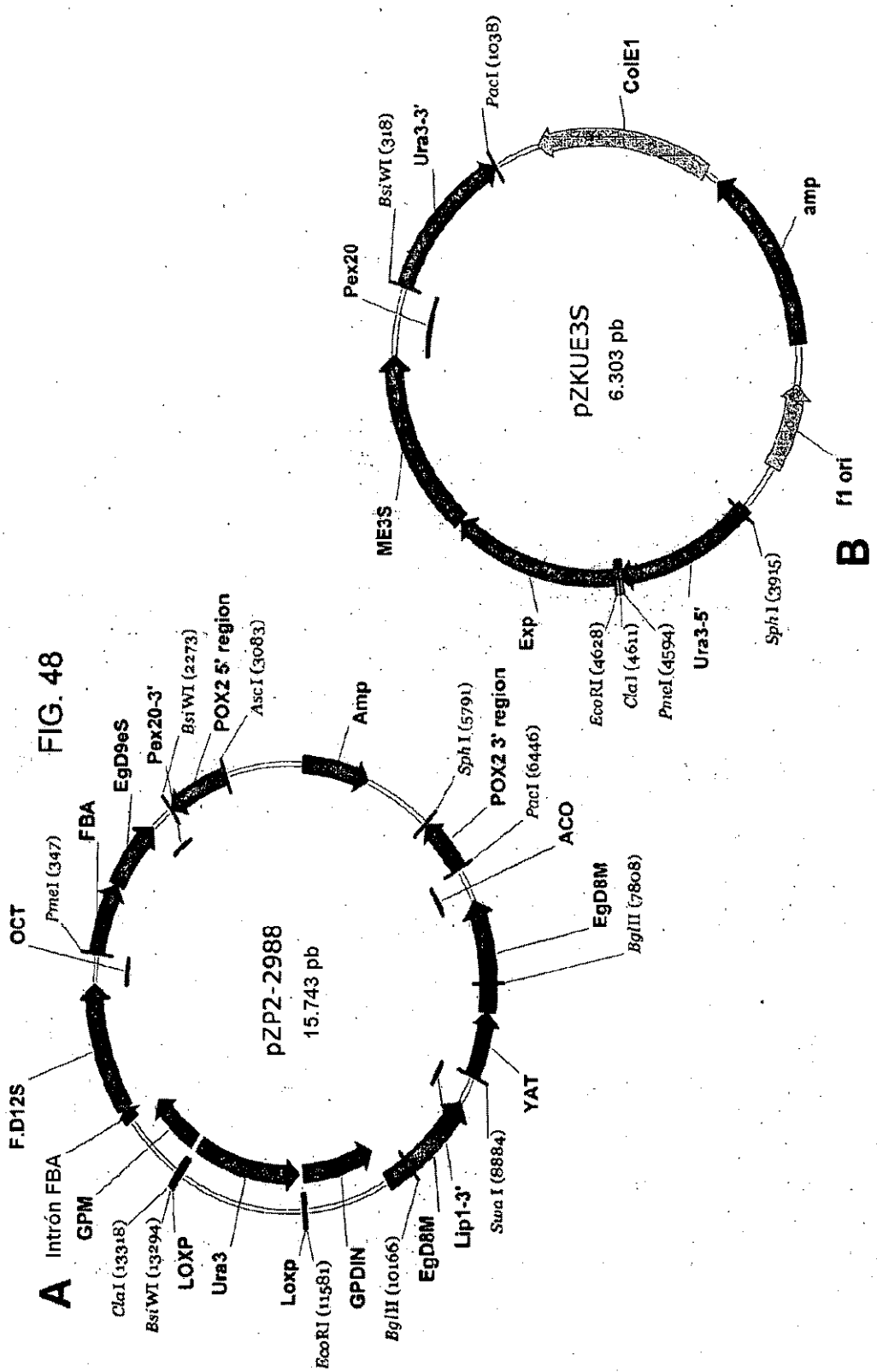

A
pZP2-2988
15.743 pb
Intrón FBA
F.D12S
GPM
ClaI (13318)
BsiWI (13294)
LOXP
Ura3
Loxp
EcoRI (11581)
GPDIN
BglII (10166)
EgD8M
Lip1-3'
SunaI (8884)
YAT
EgD8M
BglII (7808)
ACO
PacI (6446)
POX2 3' region
SphI (5791)
Amp
AscI (3083)
POX2 5' region
BsiWI (2273)
Pex20-3'
EgD9eS
FBA
PmeI (347)
OCT
B
pZKUE3S
6.303 pb
ME3S
Pex20
BsiWI (318)
Ura3-3'
PacI (1038)
ColE1
amp
f1 ori
Sph I (2915)
Ura3-5'
PmeI (4594)
ClaI (4611)
EcoRI (4628)
Exp

FIG. 48

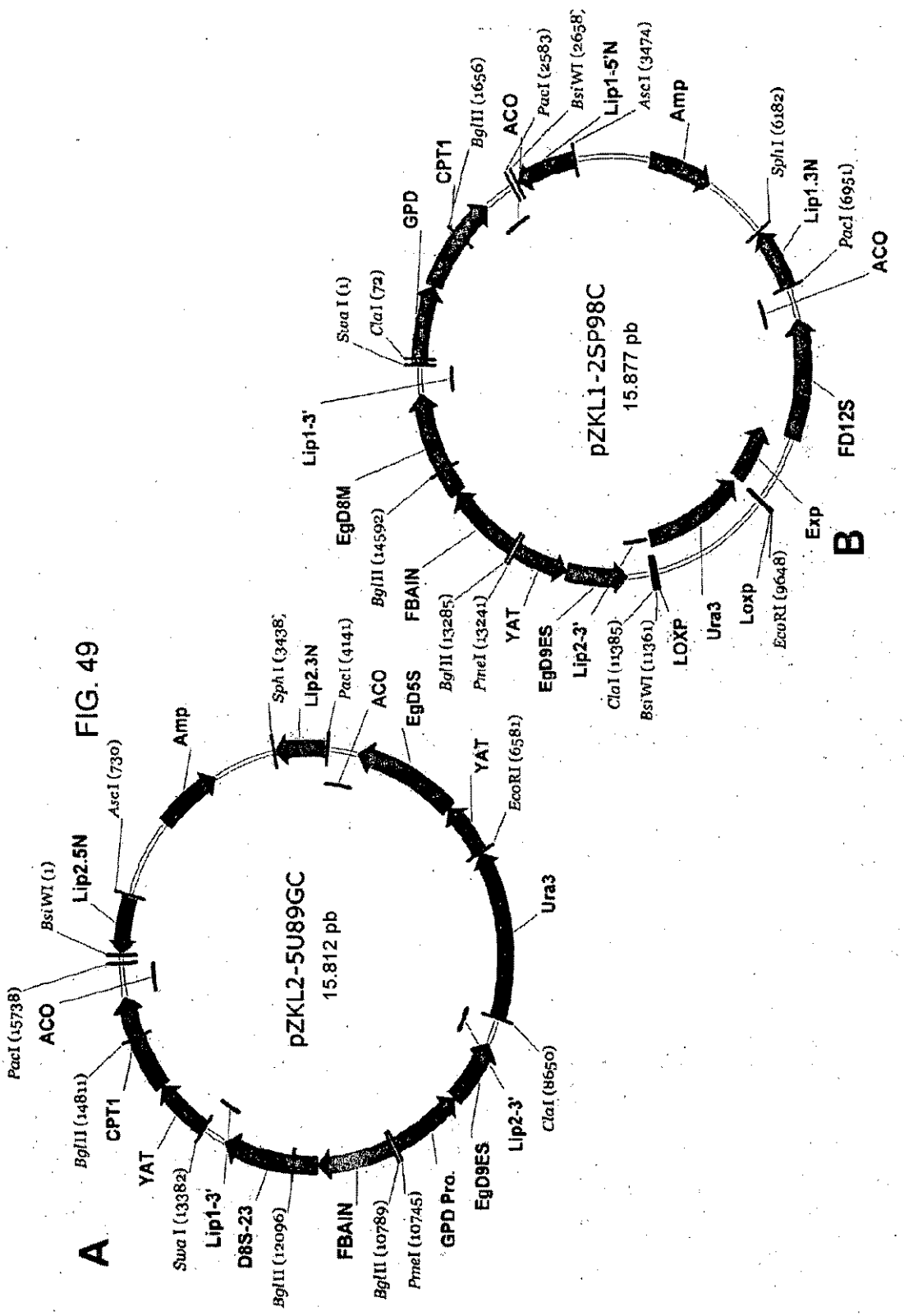

A
pZKL2-5U89GC
15.812 pb
PacI (15738)
ACO
BsiWI (1)
Lip2.5N
AscI (730)
Amp
SphI (3438)
Lip2.3N
PacI (4141)
ACO
EgD5S
YAT
EcoRI (6581)
Ura3
ClaI (8650)
Lip2-3'
EgD9ES
GPD Pro.
PmeI (10745)
BglII (10789)
FBAIN
BglII (12096)
D8S-23
Lip1-3'
SwaI (13382)
YAT
CPT1
BglII (14811)
B
pZKL1-2SP98C
15.877 pb
SwaI (1)
ClaI (72)
Lip1-3'
EgD8M
BglII (14592)
FBAIN
BglII (13285)
PmeI (13241)
YAT
EgD9ES
Lip2-3'
ClaI (11385)
BsiWI (11361)
LOXP
Ura3
Loxp
EcoRI (9648)
Exp
FD12S
ACO
PacI (6951)
Lip1.3N
SphI (6182)
Amp
AscI (3474)
Lip1-5'N
BsiWI (2658)
PacI (2583)
ACO
BglII (1656)
CPT1
GPD

FIG. 49

FIG. 50

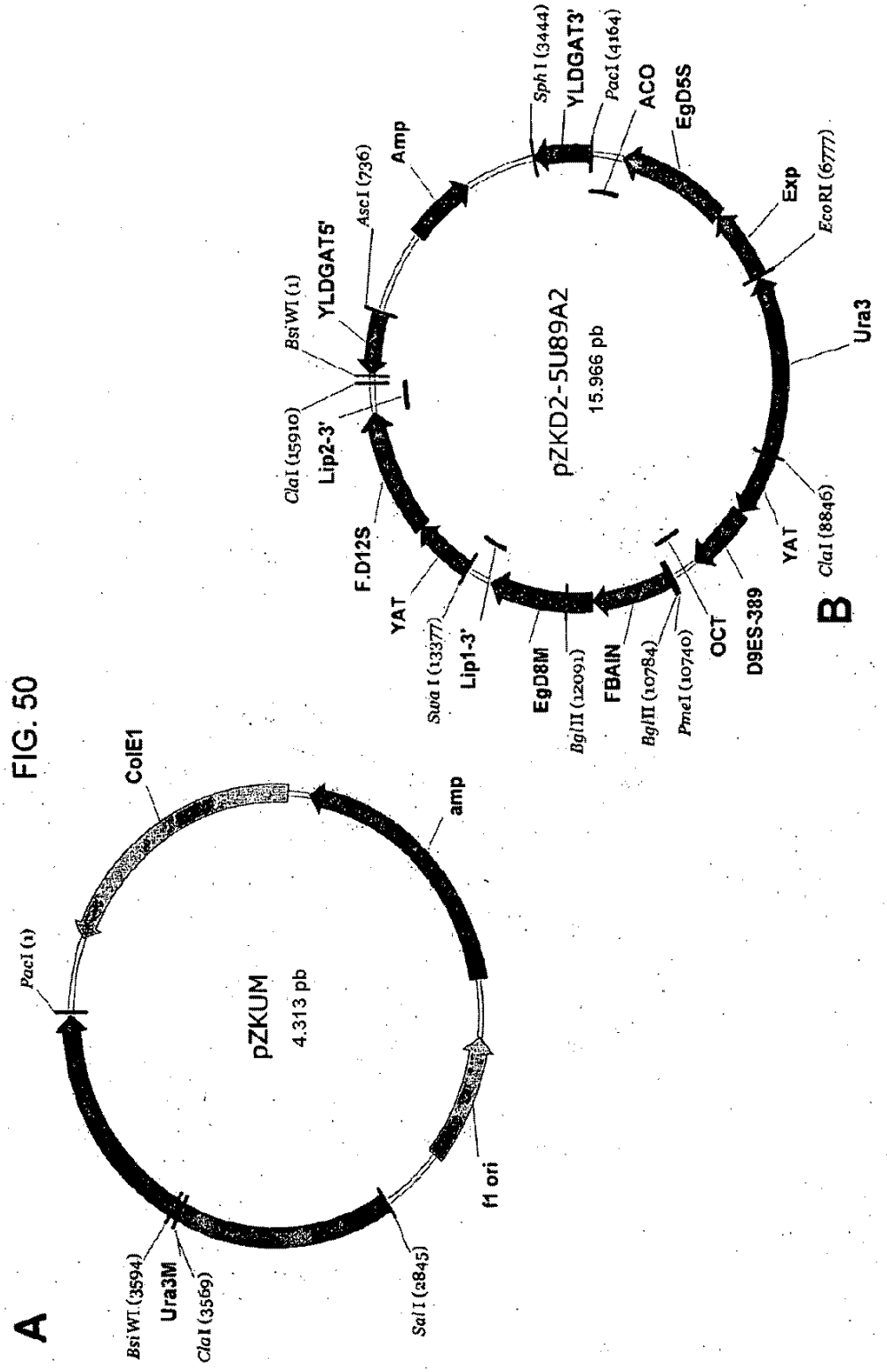

A
pZKUM
4.313 pb
PacI (1)
ColE1
amp
f1 ori
SalI (2845)
BsiWI (3594)
Ura3M
ClaI (3569)
B
pZKD2-5U89A2
15.966 pb
Sph I (3444)
YLDGAT3'
PacI (4164)
ACO
EgD5S
Exp
EcoRI (6777)
Ura3
ClaI (8846)
YAT
D9ES-389
OCT
PmeI (10740)
BglII (10784)
FBAIN
EgD8M
BglII (12091)
Lip1-3'
SwaI (13377)
YAT
F.D12S
Lip2-3'
ClaI (15910)
BsiWI (1)
YLDGAT5'
AscI (736)
Amp

FIG. 51

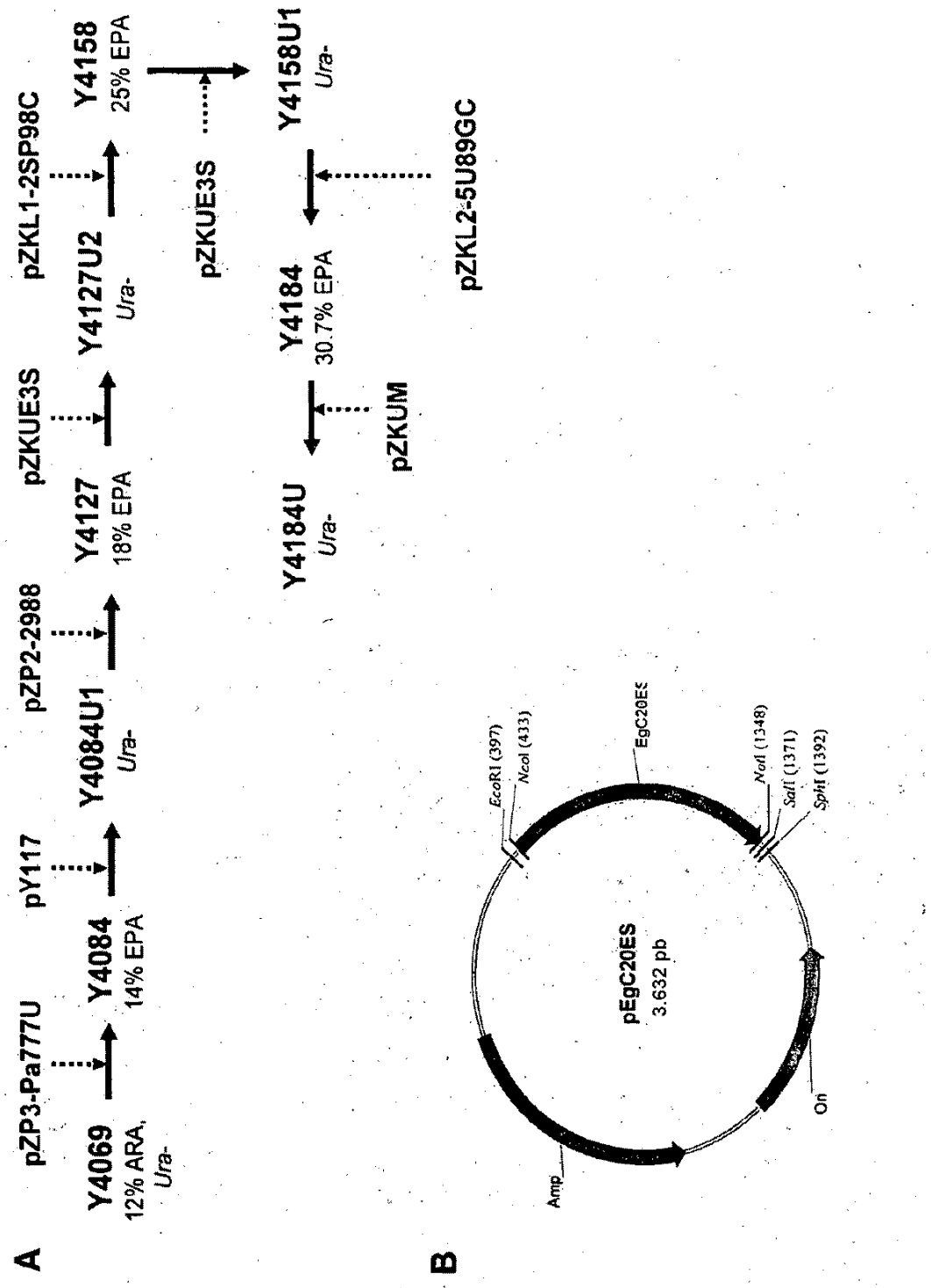

A
Y4069
12% ARA, Ura-
pZP3-Pa777U
Y4084
14% EPA
pY117
Y4084U1
Ura-
pZP2-2988
Y4127
18% EPA
pZKUE3S
Y4127U2
Ura-
pZKL1-2SP98C
Y4158
25% EPA
pZKUE3S
Y4158U1
Ura-
pZKL2-5U89GC
Y4184
30.7% EPA
pZKUM
Y4184U
Ura-
B
pEgC20ES
3.632 pb
EcoRI (397)
NcoI (433)
EgC20ES
NotI (1348)
SalI (1371)
SphI (1392)
Ori
Amp

FIG. 52

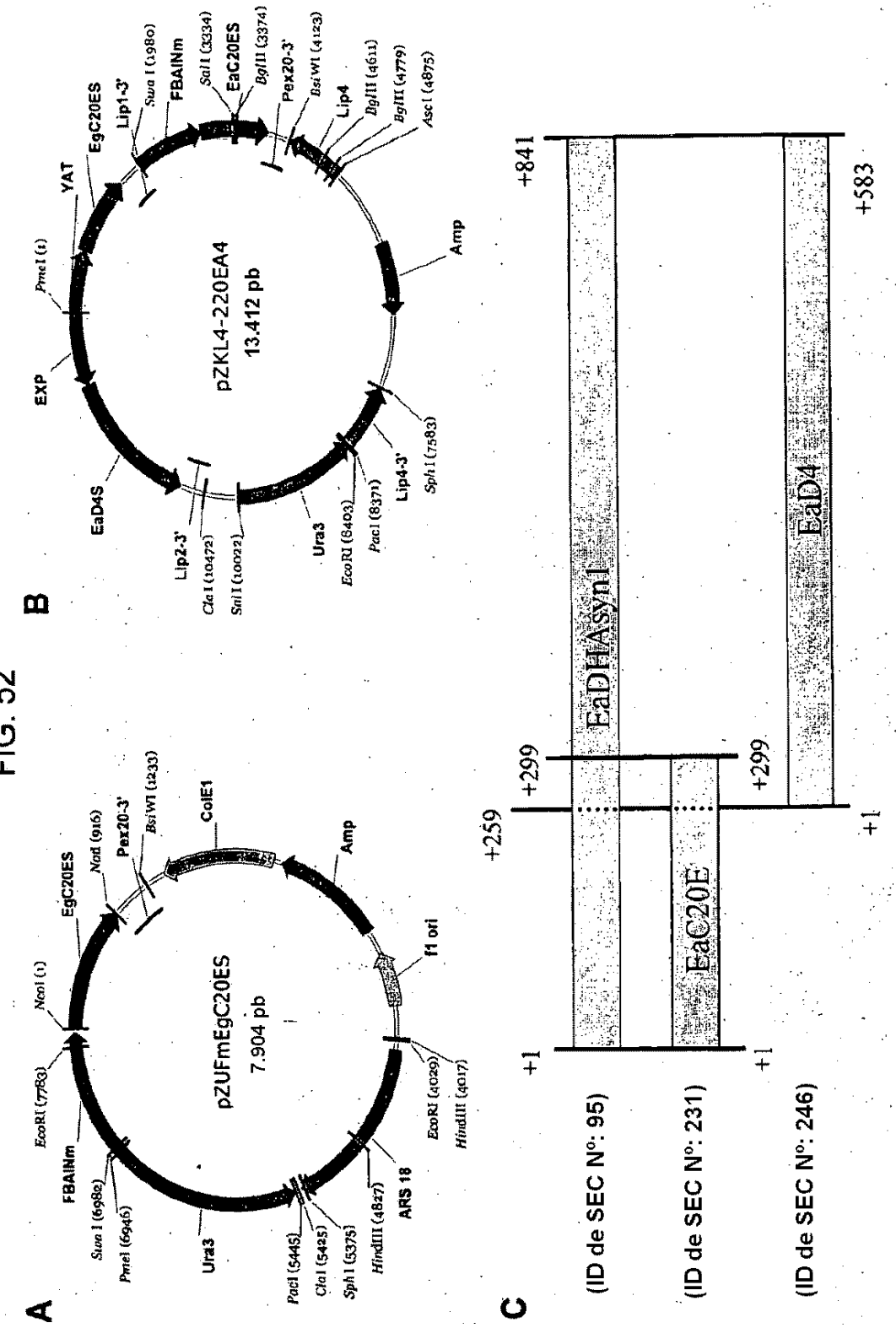
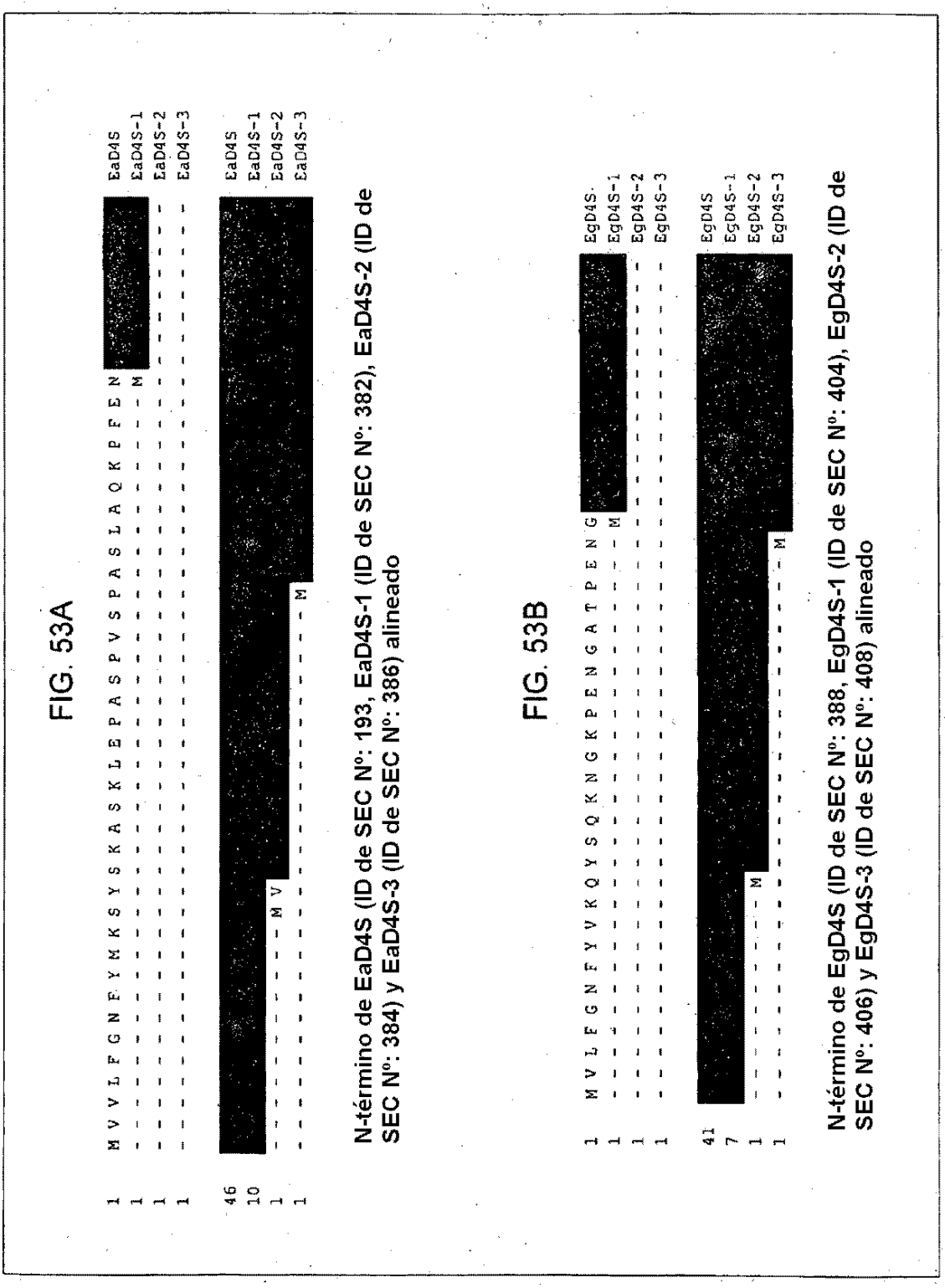

A
pZUFmEgC20ES
7.904 pb
NcoI (1)
EgC20ES
NotI (916)
Pex20-3'
BsiWI (1233)
ColE1
Amp
f1 ori
EcoRI (4029)
HindIII (4017)
ARS 18
HindIII (4827)
SphI (5375)
ClaI (5425)
PacI (5445)
Ura3
PmeI (6946)
SwaI (6980)
FBAINm
EcoRI (7783)
B
pZKL4-220EA4
13.412 pb
PmeI (1)
YAT
EgC20ES
Lip1-3'
SwaI (1980)
FBAINm
SalI (3234)
EaC20ES
BglII (3374)
Pex20-3'
BsiWI (4123)
Lip4
BglII (4611)
BglII (4779)
AscI (4875)
Amp
SphI (7583)
Lip4-3'
PacI (8371)
EcoRI (8402)
Ura3
SalI (10022)
ClaI (10472)
Lip2-3'
EaD4S
EXP
C
+841
+583
+299
+299
+259
+1
+1
+1
EaDHASyn1
EaC20E
EaD4
(ID de SEC Nº: 95)
(ID de SEC Nº: 231)
(ID de SEC Nº: 246)

FIG. 53A



N-término de EaD4S (ID de SEC Nº: 193, EaD4S-1 (ID de SEC Nº: 382), EaD4S-2 (ID de SEC Nº: 384) y EaD4S-3 (ID de SEC Nº: 386) alineado

FIG. 53B

N-término de EgD4S (ID de SEC Nº: 388, EgD4S-1 (ID de SEC Nº: 404), EgD4S-2 (ID de SEC Nº: 406) y EgD4S-3 (ID de SEC Nº: 408) alineado

FIG. 54

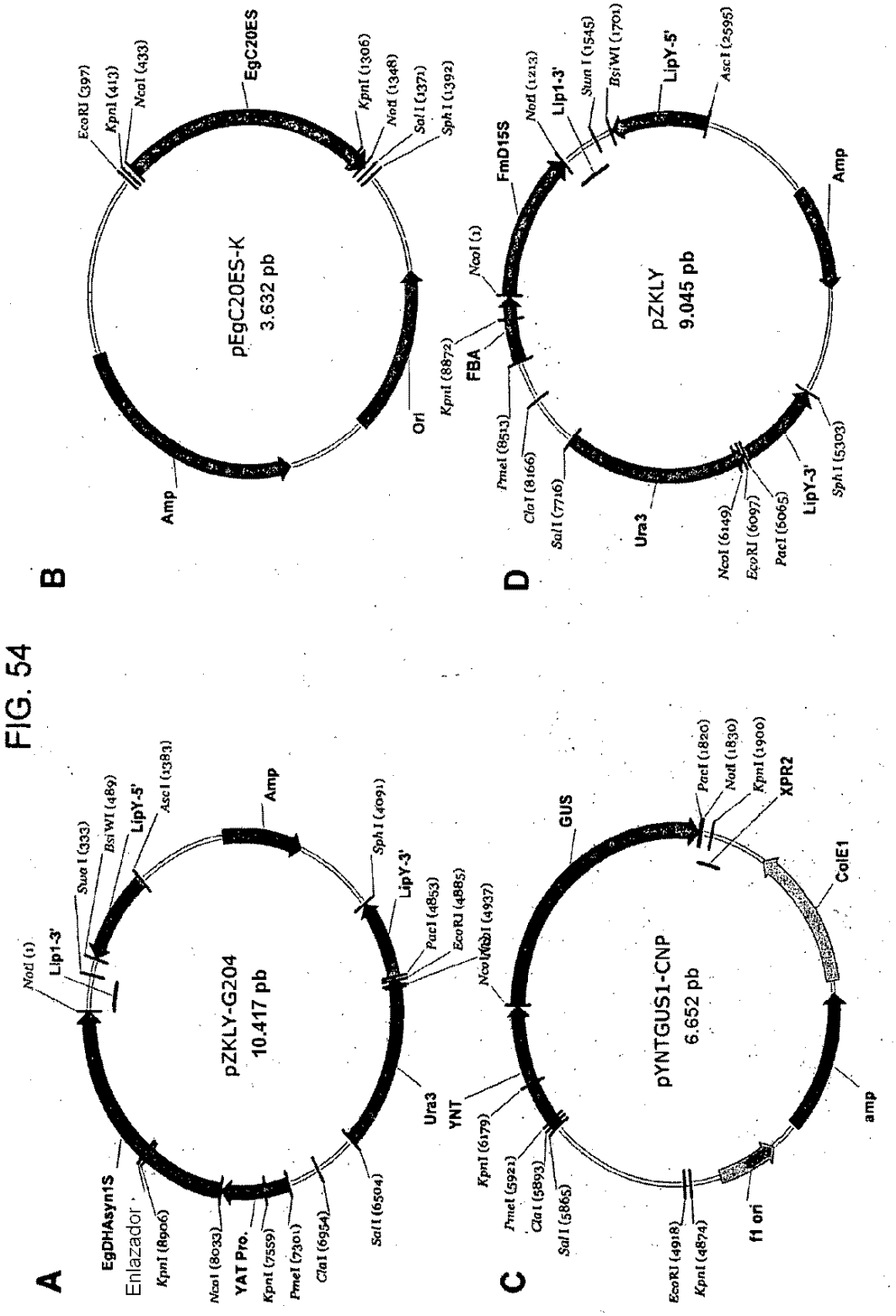

A
pZKLY-G204
10.417 pb
EgDHAsyn1S
Enlazador
YAT Pro.
Ura3
YNT
Amp
LipY-3'
LipY-5'
Lip1-3'
B
pEgC20ES-K
3.632 pb
EgC20ES
Amp
Ori
C
pYNTGUS1-CNP
6.652 pb
GUS
XPR2
ColE1
amp
f1 ori
D
pZKLY
9.045 pb
FmD15S
FBA
Lip1-3'
LipY-5'
LipY-3'
Ura3
Amp

FIG. 55

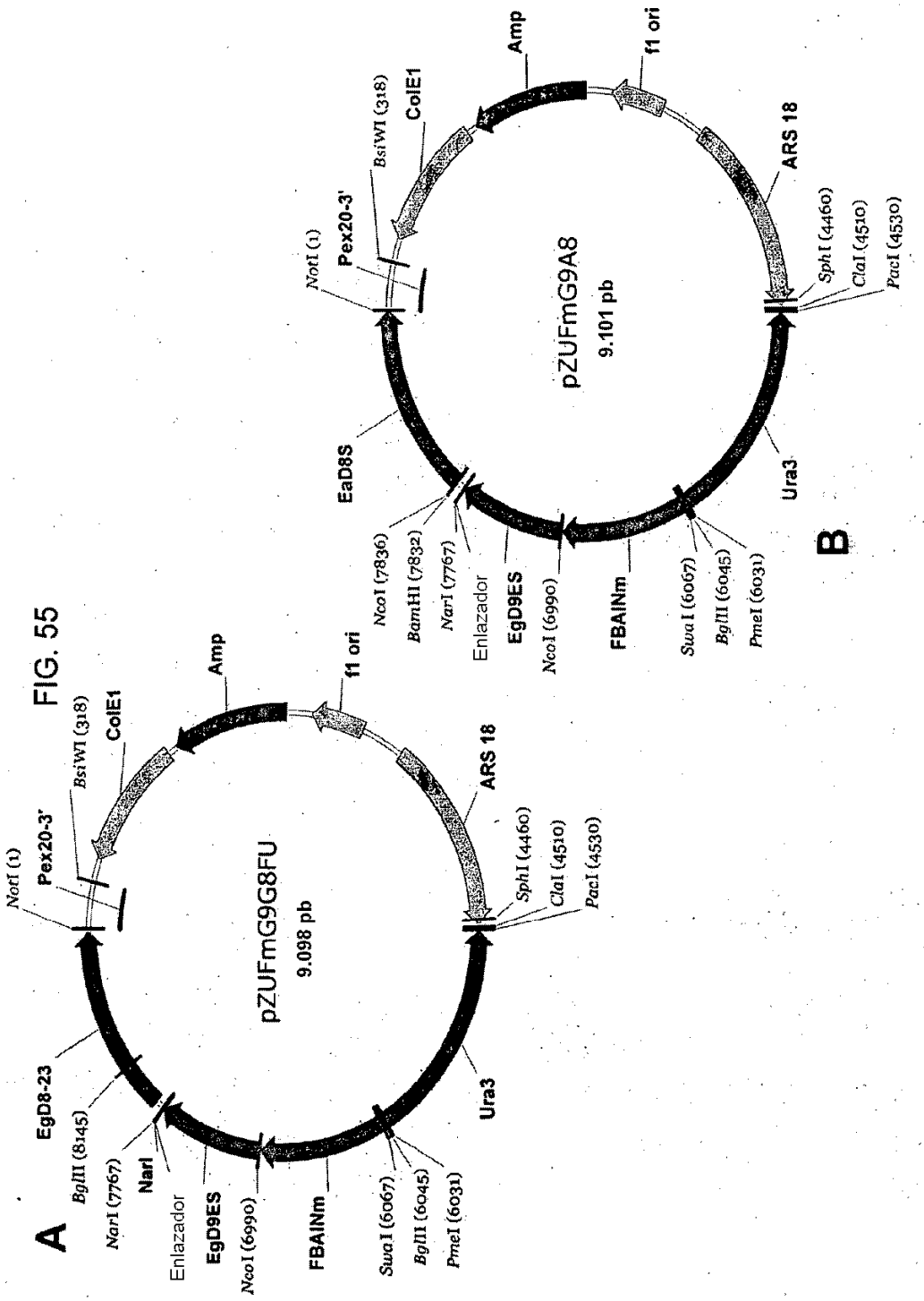

A
pZUFmG9G8FU
9.098 pb
NotI (1)
Pex20-3'
BsiWI (318)
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
SphI (4460)
ClaI (4510)
PacI (4530)
Ura3
PmeI (6031)
BglII (6045)
SwaI (6067)
FBAINm
NcoI (6990)
EgD9ES
Enlazador
NarI (7767)
BglII (8145)
EgD8-23
B
pZUFmG9A8
9.101 pb
NotI (1)
Pex20-3'
BsiWI (318)
ColE1
Amp
f1 ori
ARS 18
SphI (4460)
ClaI (4510)
PacI (4530)
Ura3
PmeI (6031)
BglII (6045)
SwaI (6067)
FBAINm
NcoI (6990)
EgD9ES
Enlazador
NarI (7767)
BamHI (7832)
NcoI (7836)
EaD8S

FIG. 56

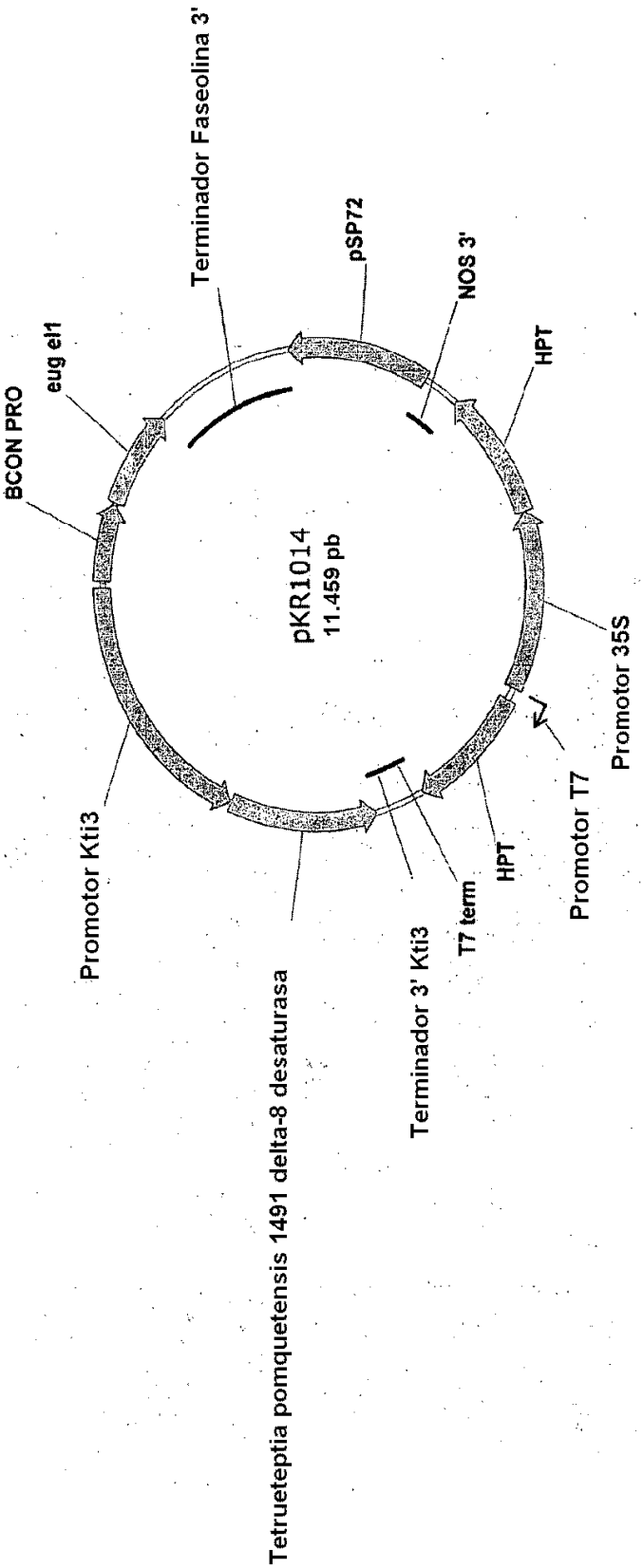

pKR1014
11.459 pb
Terminador Faseolina 3'
pSP72
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
Terminador 3' Kti3
Tetrueteptia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa
Promotor Kti3
BCON PRO
eug el1

FIG. 57

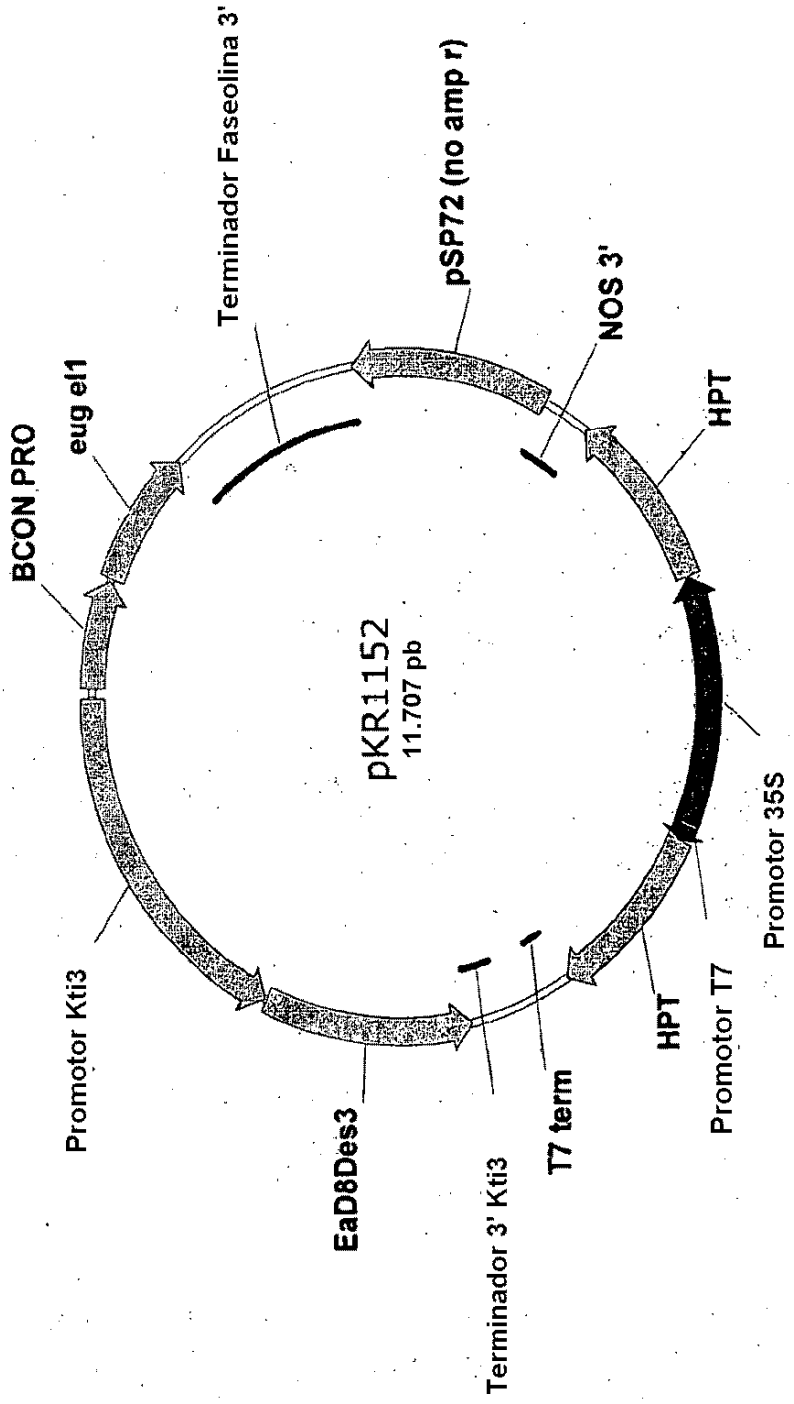

pKR1152
11.707 pb
Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
Terminador 3' Kti3
EaD8Des3
Promotor Kti3
BCON PRO
eug el1

FIG. 58

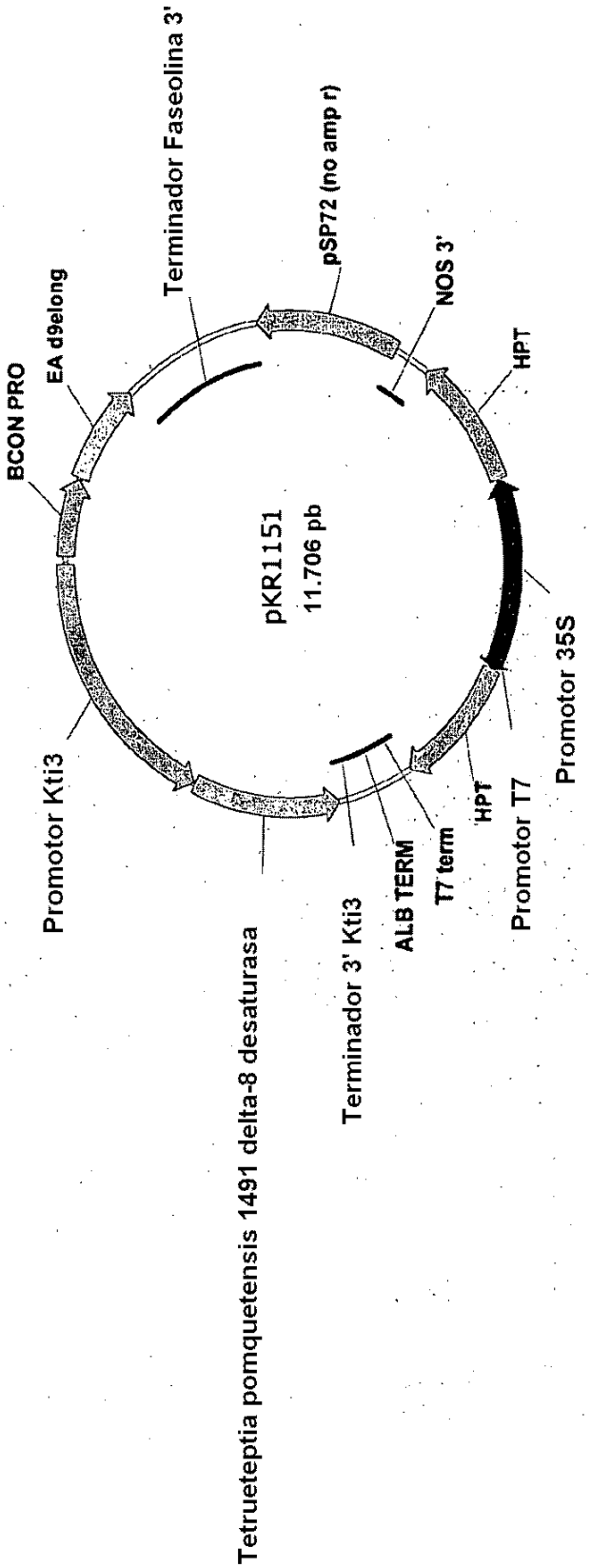

pKR1151
11.706 pb
Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
ALB TERM
Terminador 3' Kti3
Tetrueteptia pomquetensis 1491 delta-8 desaturasa
Promotor Kti3
BCON PRO
EA d9elong

FIG. 59

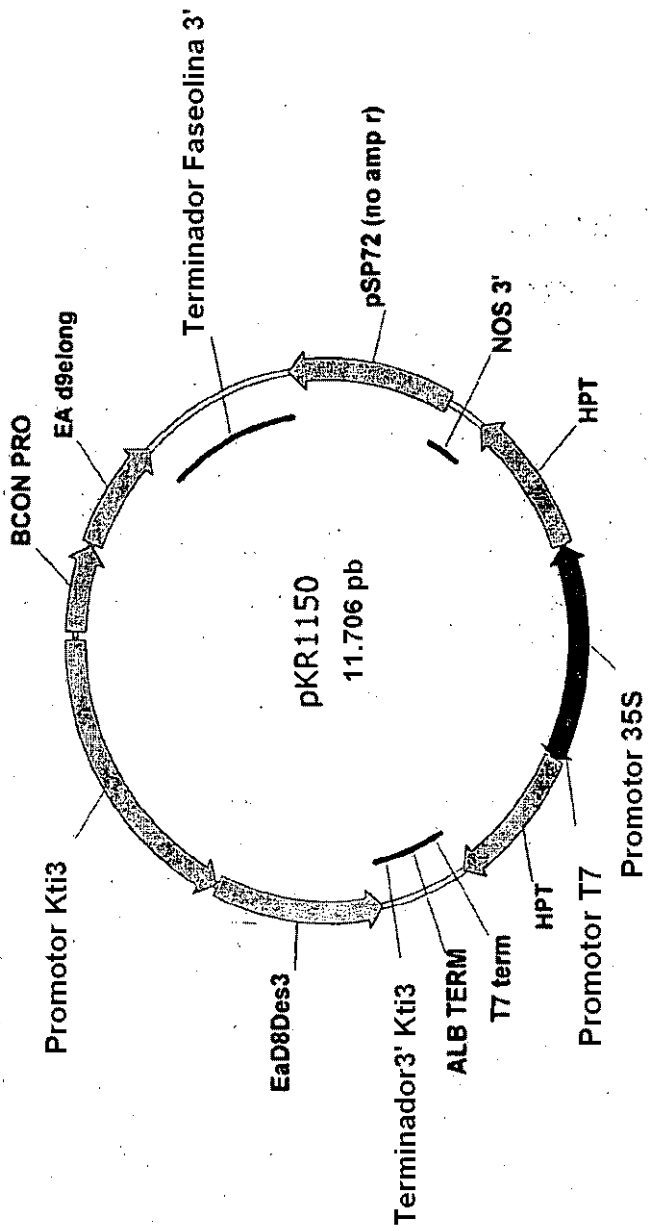

pKR1150
11.706 pb
Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
Promotor T7
HPT
T7 term
ALB TERM
Terminador3' Kti3
EaD8Des3
Promotor Kti3
BCON PRO
EA d9elong

FIG. 60

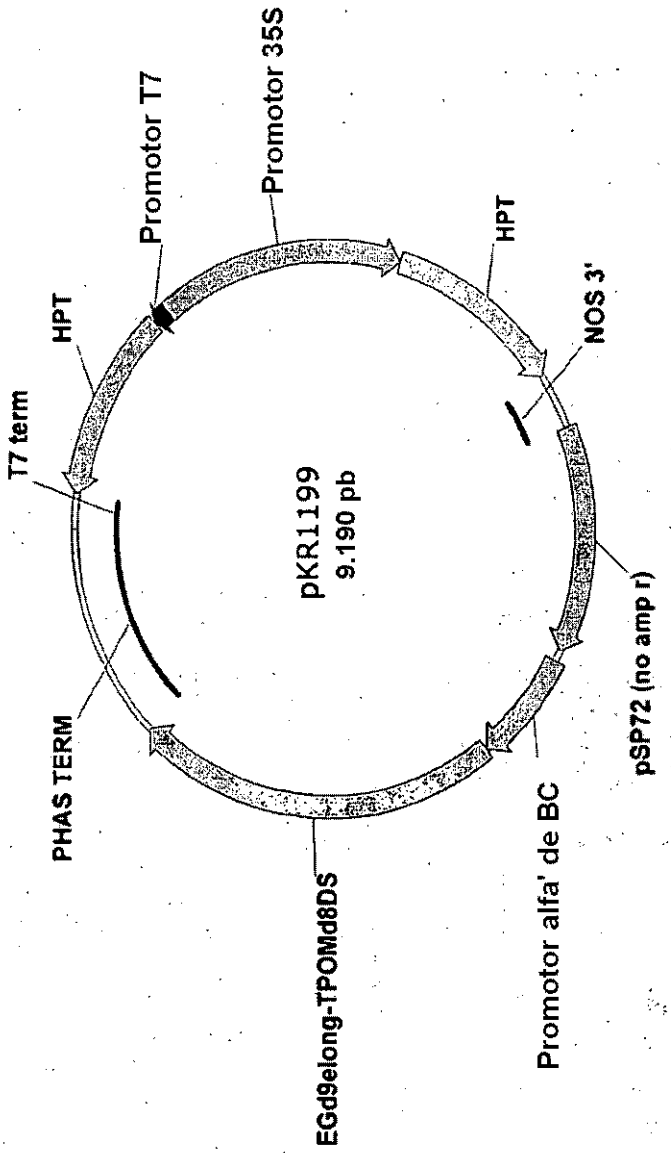

Promotor T7
Promotor 35S
HPT
NOS 3'
T7 term
HPT
pKR1199
9.190 pb
PHAS TERM
EGd9elong-TPOMd8DS
Promotor alfa' de BC
pSP72 (no amp r)

FIG. 61

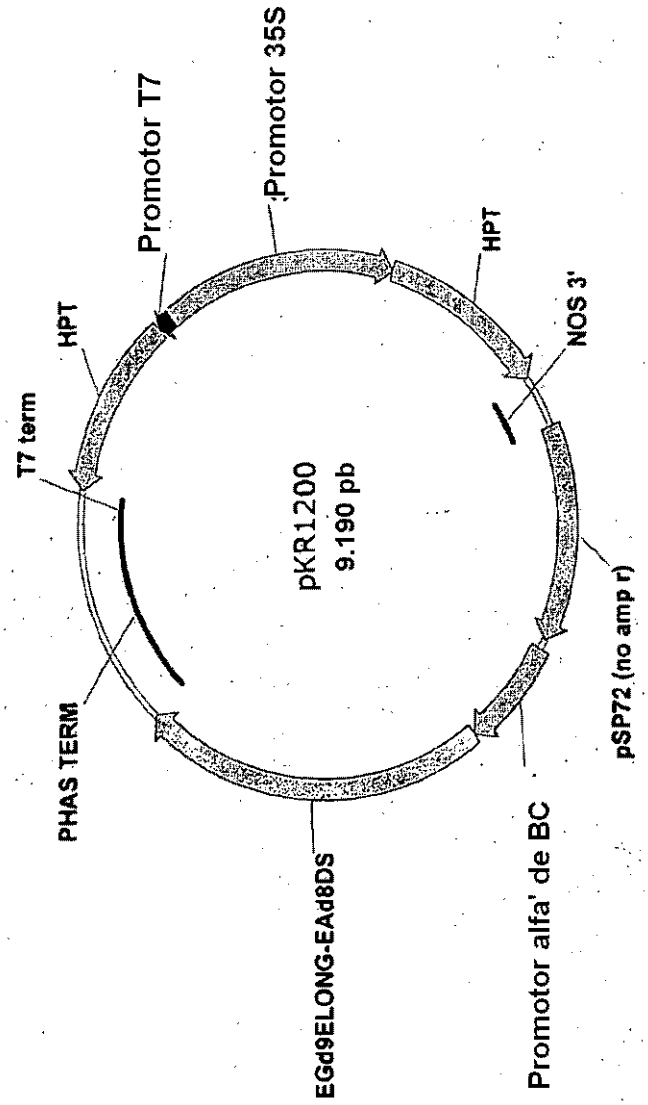

pKR1200
9.190 pb
Promotor T7
Promotor 35S
HPT
NOS 3'
pSP72 (no amp r)
Promotor alfa' de BC
EGd9ELONG-EAd8DS
PHAS TERM
T7 term
HPT

FIG. 62

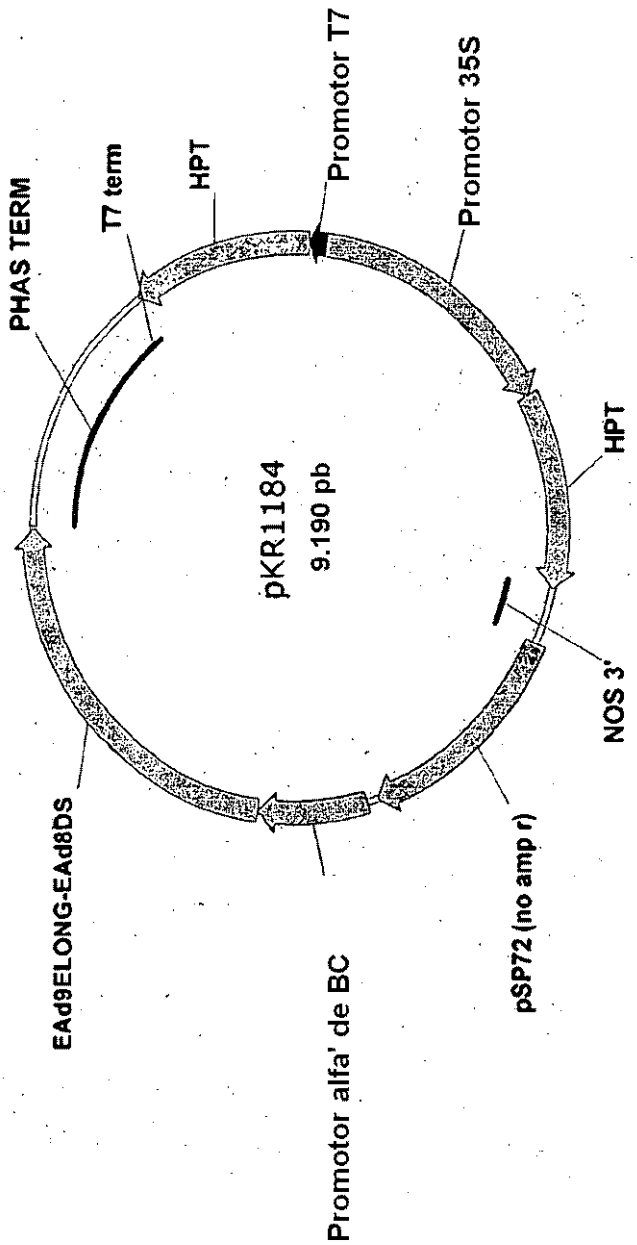

PHAS TERM
T7 term
HPT
Promotor T7
Promotor 35S
HPT
NOS 3'
pSP72 (no amp r)
Promotor alfa' de BC
EAd9ELONG-EAd8DS
pKR1184
9.190 pb

FIG. 63

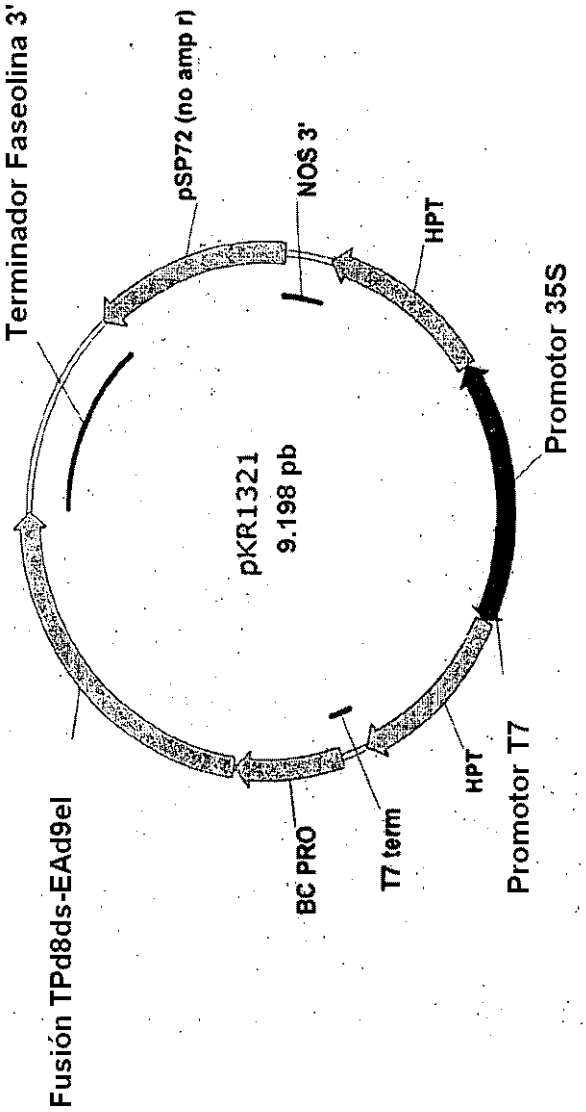
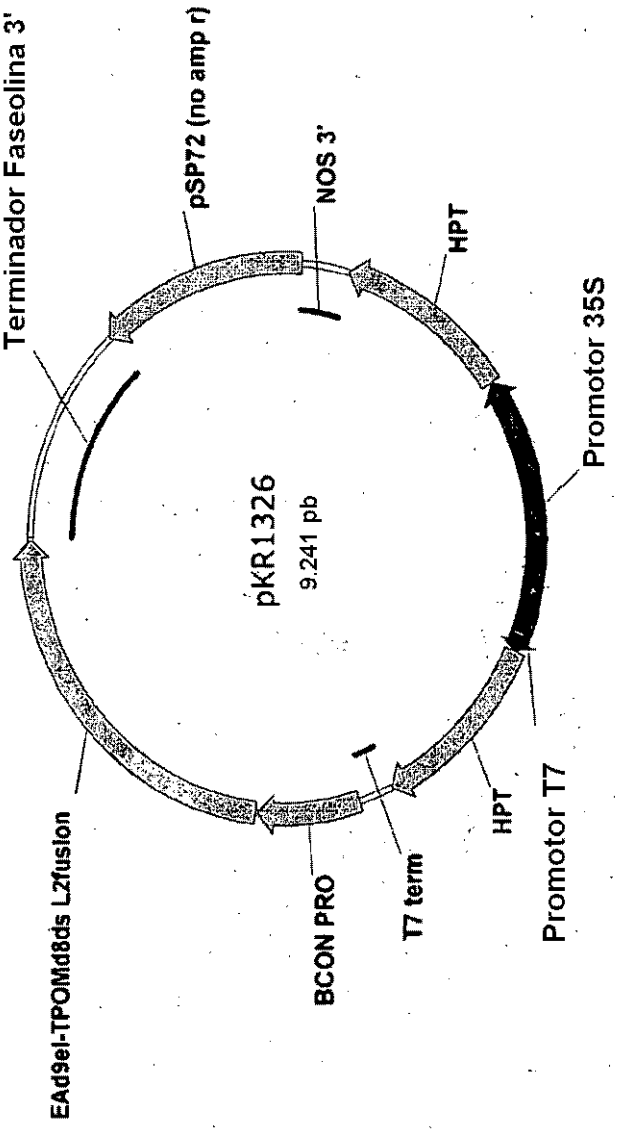

Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
pKR1321
9.198 pb
Fusión TPd8ds-EAd9el
BC PRO
T7 term
HPT
Promotor T7

FIG. 64


Terminador Faseolina 3'
pSP72 (no amp r)
NOS 3'
HPT
Promotor 35S
pKR1326
9.241 pb
EAd9el-TPOMd8ds LZfusion
BCON PRO
T7 term
HPT
Promotor T7

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2024-2-11-1	20.3	6.6	16.3	29.6	12.3	4.9	6.7	1.0	2.4	26.3	60.7
2024-2-11-2	17.1	4.8	21.7	28.7	12.1	4.8	7.4	0.7	2.7	27.7	64.7
2024-2-11-3	18.3	5.1	17.7	30.7	13.6	4.5	6.7	0.9	2.5	24.8	63.3
2024-2-11-4	18.9	5.0	13.2	32.5	14.7	5.0	7.2	0.9	2.7	25.0	62.6
2024-2-11-5	21.1	5.9	17.5	29.1	11.5	5.4	6.2	1.0	2.3	26.7	57.2
2024-2-11-6	19.5	6.2	17.7	29.7	11.9	5.7	6.5	0.8	2.1	26.7	57.0
Promedio	19.2	5.6	17.3	30.1	12.7	5.0	6.8	0.9	2.4	26.2	60.9
2024-3-5-1	16.9	4.9	17.2	23.2	7.5	11.8	13.2	1.7	3.8	49.8	55.7
2024-3-5-2	17.1	5.3	24.1	23.2	9.3	8.1	9.0	1.2	2.7	39.2	55.6
2024-3-5-3	15.3	6.1	34.5	16.6	6.0	7.8	9.7	1.0	3.0	48.8	59.1
2024-3-5-4	17.4	7.2	24.5	20.8	6.5	9.0	10.7	1.3	2.5	46.3	55.9
2024-3-5-5	17.6	6.6	22.5	22.1	8.8	8.3	9.8	1.5	2.8	42.1	56.1
2024-3-5-6	17.0	6.7	23.2	19.8	6.1	10.7	11.9	1.4	3.2	51.2	55.5
Promedio	16.9	6.1	24.3	20.9	7.4	9.3	10.7	1.4	3.0	46.2	56.3
2024-3-9-1	16.9	5.1	24.7	16.5	6.2	11.2	14.1	1.5	3.7	57.5	58.3
2024-3-9-2	16.2	5.2	19.9	20.0	6.1	11.5	16.0	1.3	3.9	55.6	60.8
2024-3-9-3	16.4	5.6	25.3	17.1	5.7	10.4	14.3	1.4	3.8	56.7	60.5
2024-3-9-4	16.3	5.5	28.7	15.9	6.4	9.2	13.1	1.3	3.7	55.1	61.4
2024-3-9-5	15.8	6.4	27.6	14.2	5.5	10.3	15.2	1.3	3.7	60.7	62.1
2024-3-9-6	16.3	5.0	22.2	17.9	5.6	11.8	15.9	1.4	3.8	58.4	59.9
Promedio	16.3	5.5	24.7	16.9	5.9	10.7	14.8	1.4	3.8	57.3	60.5
2024-3-11-1	17.9	6.5	24.3	22.9	7.9	8.1	9.1	1.0	2.3	40.0	55.5
2024-3-11-2	16.0	6.2	29.6	20.5	6.4	9.4	8.3	1.2	2.3	44.0	49.9
2024-3-11-3	18.1	7.6	24.5	18.9	5.4	9.7	11.9	1.1	2.9	51.3	57.9
2024-3-11-4	16.3	6.5	27.0	21.7	6.7	8.2	9.8	1.1	2.5	43.2	56.7
2024-3-11-5	16.0	6.4	28.5	19.8	6.3	8.3	10.8	1.1	2.8	46.8	59.3
2024-3-11-6	17.2	7.2	29.1	19.3	5.4	8.3	9.9	1.1	2.5	46.8	56.8
Promedio	16.9	6.7	27.2	20.5	6.4	8.7	10.0	1.1	2.5	45.3	56.0
2024-3-15-1	16.9	4.3	15.7	28.9	11.0	6.9	11.5	1.1	3.4	36.5	65.0
2024-3-15-2	15.8	4.2	19.5	27.4	7.9	7.5	13.5	0.7	3.1	41.3	66.8
2024-3-15-3	19.3	7.0	19.3	22.8	9.1	11.4	6.5	2.9	1.7	41.4	36.5
2024-3-15-4	16.9	3.7	9.6	30.2	13.2	7.4	13.4	2.0	3.2	37.5	63.7
2024-3-15-5	17.0	4.5	12.9	29.8	13.6	6.9	10.6	1.8	2.8	33.7	60.6
2024-3-15-6	17.7	5.5	20.4	25.2	10.7	5.4	10.7	1.0	3.2	36.0	68.7
Promedio	17.3	4.9	16.2	27.4	10.9	7.6	11.0	1.6	2.9	37.7	60.2

FIG. 65

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2136-1-3-1	17.7	4.2	12.0	30.3	12.0	8.8	10.2	1.0	3.1	35.3	57.8
2136-1-3-2	17.7	3.6	11.3	25.9	9.3	10.7	15.4	1.3	4.4	47.4	62.2
2136-1-3-3	17.8	3.8	9.1	25.2	9.3	10.3	17.4	1.3	5.0	49.6	65.9
2136-1-3-4	18.9	4.5	8.2	32.3	20.6	3.4	7.5	0.7	2.1	20.6	70.2
2136-1-3-5	17.9	4.0	14.4	27.1	10.5	8.4	12.5	0.9	3.8	40.5	63.6
Promedio	18.0	4.0	11.0	28.2	12.3	8.3	12.6	1.0	3.7	38.7	64.0
2136-2-8-1	17.0	3.8	12.1	25.7	9.7	11.6	13.9	1.3	4.5	46.9	58.8
2136-2-8-2	17.1	4.0	9.7	22.6	7.5	11.4	22.3	1.0	4.4	56.5	68.3
2136-2-8-3	18.3	3.6	9.0	25.9	10.9	10.6	14.8	1.5	4.7	46.2	61.7
2136-2-8-4	18.5	3.5	9.3	25.1	11.6	9.7	15.2	1.5	4.9	46.0	64.2
2136-2-8-5	18.8	3.9	11.0	24.6	12.4	8.4	13.8	1.3	4.8	43.3	65.8
Promedio	17.9	3.8	10.2	24.8	10.4	10.3	16.0	1.3	4.7	47.8	63.8
2136-2-15-1	16.7	3.0	14.7	28.9	9.6	8.9	12.9	0.8	4.2	41.1	63.7
2136-2-15-2	16.5	3.1	12.0	30.2	12.3	8.0	12.5	1.0	4.1	37.6	65.0
2136-2-15-3	16.7	3.3	13.4	29.2	8.4	9.8	14.0	0.9	4.0	43.3	62.8
2136-2-15-4	17.8	3.4	13.3	27.6	12.5	7.5	11.8	1.1	4.5	38.3	65.5
2136-2-15-5	16.6	3.3	15.3	28.3	8.8	9.2	13.6	0.8	3.7	42.4	63.4
Promedio	16.9	3.2	13.7	28.9	10.3	8.7	13.0	0.9	4.1	40.5	64.1
2136-3-8-1	18.1	2.9	8.5	29.4	12.7	8.2	13.3	1.5	5.0	39.9	65.5
2136-3-8-2	20.1	3.1	6.6	39.3	28.2	0.7	0.6	0.3	0.4	2.9	52.3
2136-3-8-3	19.8	3.3	7.1	27.9	15.3	7.2	12.0	1.7	4.9	37.4	65.4
2136-3-8-4	19.2	3.6	9.1	25.9	13.1	7.9	13.0	1.8	5.6	42.1	65.8
2136-3-8-5	16.6	3.2	9.2	29.8	11.8	9.2	13.6	1.6	4.6	41.1	62.8
Promedio	18.7	3.2	8.1	30.5	16.2	6.6	10.5	1.4	4.1	32.7	62.4
2136-4-2-1	18.6	5.0	12.6	26.1	11.9	8.6	11.2	1.3	4.0	39.7	60.6
2136-4-2-2	16.8	3.8	9.4	25.9	9.6	11.2	15.7	1.8	5.3	48.9	61.8
2136-4-2-3	17.0	3.8	8.6	26.6	10.5	10.5	15.5	1.7	5.3	46.9	63.1
2136-4-2-4	16.8	3.0	9.0	26.3	11.2	11.1	15.1	1.8	5.3	47.0	61.3
2136-4-2-5	17.0	2.9	6.0	44.1	29.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
Promedio	17.2	3.7	9.1	29.8	14.5	8.3	11.5	1.3	4.0	36.6	49.3

FIG. 66

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2131-2-9-1	15.4	4.0	19.9	27.7	6.6	8.5	13.4	0.8	3.0	42.7	63.7
2131-2-9-2	17.0	3.6	10.5	29.9	10.9	7.7	15.1	1.4	3.5	40.4	67.1
2131-2-9-3	16.8	3.7	9.4	26.2	9.2	8.7	19.5	1.4	4.5	49.0	70.5
2131-2-9-4	16.2	3.7	14.7	29.2	8.8	8.0	14.6	0.9	3.3	41.4	66.9
2131-2-9-5	16.9	3.8	12.5	27.9	9.5	8.9	14.8	1.3	3.6	43.4	64.4
Promedio	16.5	3.8	13.4	28.2	9.0	8.3	15.5	1.2	3.6	43.4	66.5
2131-2-15-1	16.0	3.9	13.3	29.1	7.4	8.6	16.0	1.0	4.1	44.9	67.5
2131-2-15-2	15.4	3.4	10.3	27.3	5.6	11.6	20.6	1.4	4.1	53.4	65.5
2131-2-15-3	16.9	3.8	13.7	28.6	8.2	8.9	14.7	1.0	3.6	43.3	64.9
2131-2-15-4	17.3	3.2	6.6	22.2	10.3	6.5	24.1	1.7	7.3	54.9	79.3
2131-2-15-5	14.6	3.7	11.0	26.0	6.0	8.9	22.3	1.6	5.2	54.2	72.4
Promedio	16.0	3.6	11.0	26.6	7.5	8.9	19.5	1.3	4.8	50.2	69.9
2131-2-22-1	16.2	4.7	6.5	17.5	4.8	15.1	24.7	3.0	6.2	68.7	63.0
2131-2-22-2	17.3	4.9	7.0	24.2	9.7	12.5	16.4	2.6	4.4	51.5	58.0
2131-2-22-3	17.3	5.1	9.5	20.7	6.5	14.6	18.7	2.4	4.3	59.5	57.5
2131-2-22-4	18.7	5.2	7.4	18.5	5.4	12.3	23.9	2.0	5.6	64.8	67.4
2131-2-22-5	18.4	5.0	8.6	18.0	5.6	11.1	24.3	2.0	5.8	64.8	69.6
Promedio	17.6	5.0	7.8	19.8	6.4	13.1	21.6	2.4	5.3	61.9	63.1
2131-2-24-1	17.0	4.0	5.3	19.3	8.1	11.6	21.6	3.7	8.0	62.1	65.9
2131-2-24-2	17.4	4.1	6.4	19.8	5.8	9.0	26.8	2.0	7.6	63.9	75.8
2131-2-24-3	16.0	4.2	6.3	23.0	6.6	16.8	17.5	3.8	4.8	59.2	52.0
2131-2-24-4	18.0	5.9	8.4	17.2	5.6	7.9	26.4	1.7	7.6	65.7	78.0
2131-2-24-5	18.1	4.8	7.3	18.0	5.9	8.1	26.5	2.1	8.0	65.2	77.1
Promedio	17.3	4.6	6.7	19.5	6.4	10.7	23.8	2.6	7.2	63.2	69.8
2131-6-14-1	17.5	4.1	17.3	21.0	7.8	8.1	17.4	1.1	5.0	52.4	70.9
2131-6-14-2	17.5	4.7	16.4	26.4	8.5	8.3	13.1	1.2	3.1	42.4	63.2
2131-6-14-3	17.2	3.2	12.3	22.4	9.1	10.2	18.1	1.7	5.4	52.9	66.5
2131-6-14-4	18.1	3.6	10.9	24.6	9.1	7.7	19.6	1.0	4.8	49.7	73.6
2131-6-14-5	16.6	3.8	13.6	26.3	8.9	8.1	17.0	1.0	4.4	46.5	70.1
Promedio	17.4	3.9	14.1	24.1	8.7	8.5	17.1	1.2	4.6	48.8	68.8

FIG. 67

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2130-1-29-1	17.5	3.4	10.8	23.7	5.6	17.4	15.0	2.2	3.8	56.7	49.0
2130-1-29-2	16.9	3.9	11.5	24.1	6.6	15.3	14.9	2.0	4.2	54.3	52.5
2130-1-29-3	17.4	3.7	11.1	22.3	6.1	17.0	14.5	2.6	4.5	57.6	49.2
2130-1-29-4	17.8	3.8	10.5	21.8	5.7	17.1	16.0	2.4	4.4	59.1	51.1
2130-1-29-5	17.2	4.2	9.8	23.1	6.6	15.9	14.5	2.9	5.0	56.3	50.9
Promedio	17.4	3.8	10.7	23.0	6.1	16.5	15.0	2.4	4.4	56.8	50.5
2130-1-43-1	17.5	2.9	6.9	45.5	26.3	0.4	0.0	0.1	0.0	0.6	0.0
2130-1-43-2	18.0	3.4	7.5	24.3	7.2	11.8	20.2	1.5	5.5	55.3	65.8
2130-1-43-3	20.7	5.5	12.3	23.8	5.6	11.2	15.1	1.2	3.9	51.7	60.4
2130-1-43-4	18.3	4.0	8.7	23.6	7.8	12.1	17.2	1.9	5.5	53.9	61.8
2130-1-43-5	23.9	7.6	16.1	17.7	4.5	10.6	13.9	1.3	3.9	57.2	59.9
Promedio	19.7	4.7	10.3	27.0	10.3	9.2	13.3	1.2	3.8	43.7	49.6
2130-1-51-1	17.4	4.6	9.8	24.1	7.2	13.8	15.7	2.1	4.3	53.5	55.6
2130-1-51-2	18.7	3.9	9.4	20.7	6.0	14.1	18.3	2.6	5.6	60.4	58.8
2130-1-51-3	18.4	3.8	9.3	20.4	6.6	13.4	19.0	2.3	5.9	60.0	61.3
2130-1-51-4	17.9	4.1	9.6	20.4	5.2	15.2	19.1	2.3	5.2	62.0	58.2
2130-1-51-5	21.6	6.4	12.8	20.1	7.6	11.4	12.4	2.4	4.1	52.3	54.5
Promedio	18.8	4.6	10.2	21.1	6.5	13.6	16.9	2.3	5.0	57.6	57.7
2130-1-54-1	16.4	4.2	13.5	28.5	6.9	11.0	14.6	1.0	3.7	46.1	60.6
2130-1-54-2	18.1	4.1	10.8	26.2	6.9	12.3	15.9	1.3	3.9	50.3	59.4
2130-1-54-3	17.5	4.1	11.9	27.2	7.3	10.2	16.6	0.8	3.7	47.6	64.9
2130-1-54-4	16.7	4.2	10.9	28.3	7.3	14.9	12.3	1.6	3.2	47.3	48.4
2130-1-54-5	17.1	4.3	12.0	27.0	7.3	10.6	15.6	1.1	4.3	47.9	62.9
Promedio	17.2	4.2	11.8	27.5	7.1	11.8	15.0	1.2	3.8	47.9	59.2
2130-1-61-1	21.4	5.2	7.3	19.5	6.1	13.7	15.6	3.2	7.0	60.7	57.2
2130-1-61-2	17.2	3.5	5.4	20.3	7.8	14.4	18.0	4.1	8.7	61.6	58.9
2130-1-61-3	17.3	4.4	6.9	25.0	9.4	13.1	14.1	3.1	5.7	51.1	55.0
2130-1-61-4	21.0	7.1	11.2	18.1	6.6	11.0	15.7	2.7	6.0	58.9	61.2
2130-1-61-5	20.1	4.3	6.7	19.9	5.9	14.7	17.3	3.3	6.7	61.9	57.2
Promedio	19.4	4.9	7.5	20.6	7.2	13.4	16.1	3.3	6.8	58.8	57.9

FIG. 68

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2153-1-3-1	15.4	5.1	27.5	25.7	7.7	5.3	10.4	0.5	2.3	35.6	68.6
2153-1-3-2	17.2	3.5	15.5	36.1	18.6	3.2	4.2	0.5	1.1	14.2	58.3
2153-1-3-3	16.4	5.1	28.3	24.2	8.6	4.8	9.6	0.6	2.4	34.6	69.3
2153-1-3-4	16.0	3.9	24.1	26.9	9.4	6.6	9.9	0.8	2.5	35.3	62.8
2153-1-3-5	15.6	3.9	25.5	26.7	7.7	6.6	11.0	0.6	2.5	37.6	65.2
Promedio	16.1	4.3	24.2	27.9	10.4	5.3	9.0	0.6	2.2	31.5	64.8
2153-1-5-1	17.4	3.9	16.9	30.8	11.7	5.6	10.6	0.6	2.5	31.2	67.8
2153-1-5-2	16.6	4.2	19.4	29.3	10.6	6.7	10.1	0.6	2.5	33.3	63.3
2153-1-5-3	17.2	3.4	14.9	37.2	17.4	4.1	3.9	0.6	1.3	15.3	52.8
2153-1-5-4	17.5	4.4	18.8	29.1	10.7	5.1	11.1	0.6	2.7	32.9	70.4
2153-1-5-5	16.9	4.5	18.7	28.8	10.8	5.8	11.0	0.7	2.9	34.0	68.2
Promedio	17.1	4.1	17.7	31.0	12.3	5.5	9.3	0.6	2.4	29.3	64.5
2153-1-14-1	17.8	3.5	19.6	30.6	10.4	5.8	9.3	0.6	2.4	30.6	64.7
2153-1-14-2	18.2	3.7	17.5	32.0	13.5	5.1	7.4	0.7	2.0	25.1	62.1
2153-1-14-3	18.6	3.1	17.7	32.2	13.1	5.3	6.8	0.7	2.4	25.2	60.8
2153-1-14-4	18.5	3.0	14.6	33.4	12.5	6.1	8.6	0.7	2.6	28.2	62.1
2153-1-14-5	18.0	3.4	19.1	30.7	11.8	4.9	8.8	0.5	2.7	28.6	68.0
Promedio	18.2	3.3	17.7	31.8	12.3	5.4	8.2	0.6	2.4	27.5	63.6
2153-1-22-1	16.9	4.2	20.1	27.7	9.9	5.4	11.4	0.7	3.7	36.0	71.1
2153-1-22-2	17.2	3.9	18.5	32.4	13.3	4.9	6.6	0.7	2.5	24.4	61.9
2153-1-22-3	16.3	4.6	22.5	25.1	8.4	5.4	12.8	0.7	4.1	40.7	73.3
2153-1-22-4	16.3	3.7	19.2	26.2	8.0	6.6	15.2	0.7	4.1	43.8	72.5
2153-1-22-5	16.6	3.6	16.1	39.2	15.8	2.8	4.0	0.5	1.5	13.6	62.5
Promedio	16.7	4.0	19.3	30.1	11.1	5.0	10.0	0.7	3.2	31.7	68.2
2153-3-4-1	16.5	2.8	14.5	34.6	13.9	6.6	7.5	1.1	2.5	26.8	56.5
2153-3-4-2	16.4	3.1	16.0	30.9	10.9	8.0	10.5	1.2	3.1	35.3	59.8
2153-3-4-3	15.6	4.2	19.5	29.5	11.0	6.9	9.3	1.1	3.0	33.4	60.3
2153-3-4-4	15.7	3.2	17.4	31.2	11.5	7.6	9.2	1.2	3.0	32.9	57.8
2153-3-4-5	15.7	2.6	14.4	34.8	13.5	6.8	8.3	1.1	2.8	28.2	58.3
Promedio	16.0	3.2	16.3	32.2	12.2	7.2	8.9	1.1	2.9	31.3	58.5

FIG. 69

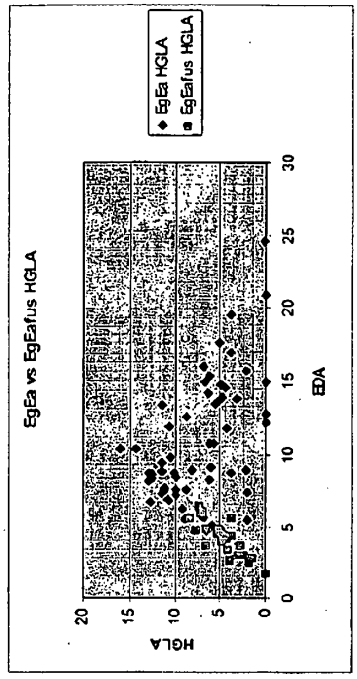
Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2154-1-3-1	18.3	4.9	29.7	23.8	8.4	4.5	7.2	0.5	2.6	31.5	66.4
2154-1-3-2	19.1	4.5	28.5	24.0	7.5	5.5	7.8	0.5	2.5	34.1	63.2
2154-1-3-3	18.8	4.4	20.9	32.2	9.3	6.7	5.6	0.6	1.7	26.0	50.0
2154-1-3-4	17.2	4.0	21.6	29.3	9.1	7.7	8.1	0.6	2.3	32.9	55.7
2154-1-3-5	16.8	3.9	29.1	24.8	9.4	5.6	6.9	0.7	2.8	31.9	60.5
Promedio	18.0	4.4	26.0	26.8	8.7	6.0	7.1	0.6	2.4	31.3	59.2
2154-1-8-1	17.6	3.5	18.7	29.9	12.3	6.2	8.4	0.7	2.8	30.0	62.0
2154-1-8-2	17.9	4.4	21.6	30.3	10.6	5.8	6.6	0.8	2.1	27.1	57.1
2154-1-8-3	18.2	3.4	18.2	30.8	11.4	7.3	7.3	0.8	2.6	30.0	54.8
2154-1-8-4	17.4	3.7	20.3	33.0	11.1	5.9	6.1	0.6	1.9	24.7	54.9
2154-1-8-5	17.7	3.6	21.2	27.7	11.0	7.2	8.0	0.8	2.9	32.8	57.9
Promedio	17.8	3.7	20.0	30.3	11.3	6.5	7.3	0.7	2.5	28.9	57.4
2154-1-12-1	18.5	4.5	22.1	28.4	10.7	5.7	7.1	0.6	2.5	28.8	60.5
2154-1-12-2	18.1	3.4	16.8	31.0	14.2	6.1	6.7	0.9	2.8	26.7	57.7
2154-1-12-3	17.7	3.6	16.5	31.7	14.2	6.4	6.8	0.7	2.4	26.3	56.2
2154-1-12-4	18.0	3.6	16.7	32.3	14.0	6.3	5.9	0.9	2.4	25.2	53.6
2154-1-12-5	18.2	3.9	18.9	30.1	12.0	5.9	7.3	0.8	2.8	28.5	60.0
Promedio	18.1	3.8	18.2	30.7	13.0	6.1	6.7	0.8	2.6	27.1	57.6
2154-1-15-1	18.3	3.1	23.9	23.4	10.5	5.8	9.8	0.8	4.4	38.0	68.1
2154-1-15-2	20.0	4.4	10.8	40.8	23.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.7	31.6
2154-1-15-3	18.2	3.2	17.9	29.0	12.3	6.2	8.6	0.8	3.9	32.1	64.2
2154-1-15-4	18.5	3.9	18.9	28.5	15.1	5.1	6.4	0.7	2.9	25.8	61.5
2154-1-15-5	18.7	3.4	17.0	28.9	13.7	5.6	8.1	0.9	3.6	29.9	64.3
Promedio	18.7	3.6	17.7	30.1	15.0	4.6	6.6	0.6	3.0	25.3	57.9
2154-2-13-1	16.2	3.6	21.8	27.7	16.5	3.4	6.5	0.8	3.5	24.3	70.4
2154-2-13-2	17.3	3.9	21.4	29.6	13.8	4.2	6.6	0.6	2.6	24.5	65.6
2154-2-13-3	16.6	3.8	17.8	32.9	15.6	3.8	6.3	0.5	2.7	21.5	67.4
2154-2-13-4	16.4	5.5	28.0	25.3	10.3	4.4	6.5	0.7	3.0	29.1	65.0
2154-2-13-5	17.2	4.7	25.1	26.2	13.3	3.0	6.7	0.5	3.3	25.4	74.2
Promedio	16.8	4.3	22.8	28.3	13.9	3.7	6.5	0.6	3.0	25.0	68.5

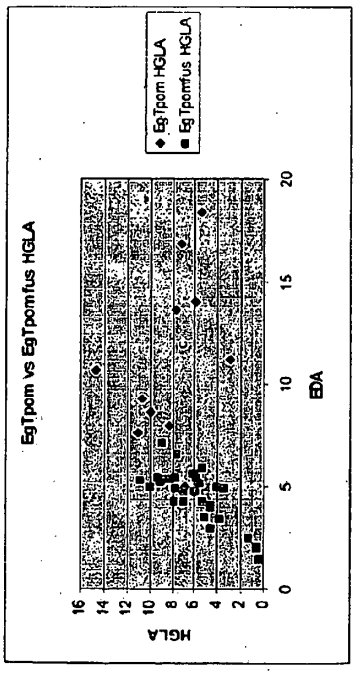
FIG. 70

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2146-2-13-1	19.7	3.8	11.6	24.2	11.6	7.9	13.5	1.2	6.5	44.8	68.6
2146-2-13-2	20.8	3.7	11.7	21.2	9.4	7.4	17.9	0.9	7.0	52.1	75.1
2146-2-13-3	20.1	3.0	7.0	24.3	11.6	7.6	17.3	1.1	8.1	48.8	74.6
2146-2-13-4	20.8	3.7	10.2	22.3	10.3	7.4	16.5	1.0	7.7	50.0	74.1
2146-2-13-5	18.9	3.3	9.5	25.0	14.2	6.4	14.2	1.2	7.4	42.7	74.0
Promedio	20.1	3.5	10.0	23.4	11.4	7.3	15.9	1.1	7.4	47.7	73.3
2146-3-2-1	16.8	3.2	10.8	26.3	12.2	6.2	12.1	1.0	5.6	39.3	71.1
2146-3-2-2	19.1	4.4	13.6	26.8	14.9	4.8	10.1	1.0	5.3	33.6	72.8
2146-3-2-3	18.4	4.0	14.7	24.7	12.2	5.7	12.7	1.0	6.5	41.3	74.1
2146-3-2-4	18.4	3.6	12.5	27.9	15.1	5.1	10.6	1.0	5.9	34.5	72.9
2146-3-2-5	19.7	4.0	13.5	28.0	13.5	5.4	10.1	0.9	4.8	33.9	70.1
Promedio	18.5	3.8	13.0	26.7	13.6	5.4	11.1	1.0	5.6	36.5	72.2
2146-3-9-1	19.0	3.1	10.3	26.3	10.7	7.4	14.8	1.2	7.2	45.2	72.0
2146-3-9-2	16.9	3.8	12.5	26.4	12.0	6.9	13.1	1.3	7.1	42.6	71.3
2146-3-9-3	19.5	3.7	11.5	26.5	11.3	6.1	13.7	1.0	6.7	42.1	74.0
2146-3-9-4	17.9	3.9	13.1	26.4	13.5	6.7	10.9	1.4	6.2	38.7	67.8
2146-3-9-5	17.9	4.2	15.0	25.6	11.2	6.1	12.4	1.1	6.6	41.6	72.7
Promedio	18.2	3.8	12.5	26.2	11.7	6.6	13.0	1.2	6.7	42.0	71.6
2146-3-13-1	16.1	3.9	16.5	29.2	7.9	9.9	11.0	1.0	4.5	41.6	58.7
2146-3-13-2	16.7	3.4	15.2	29.9	10.6	7.2	11.3	1.1	4.6	37.3	65.8
2146-3-13-3	16.0	4.4	16.5	29.2	9.2	7.9	11.1	1.0	4.8	39.2	64.1
2146-3-13-4	17.5	3.4	11.8	31.4	13.9	6.8	9.7	1.1	4.3	32.5	64.1
2146-3-13-5	16.5	3.4	15.0	30.3	10.2	7.9	11.1	1.2	4.5	37.8	63.3
Promedio	16.6	3.7	15.0	30.0	10.3	7.9	10.8	1.1	4.5	37.7	63.2
2146-3-19-1	16.4	3.6	13.6	32.0	12.5	7.6	9.3	1.1	4.0	33.1	60.5
2146-3-19-2	18.8	3.8	10.4	30.3	15.2	5.4	10.2	1.1	4.8	32.1	69.9
2146-3-19-3	16.9	2.9	9.7	30.4	10.3	8.2	14.8	1.1	5.7	42.3	68.6
2146-3-19-4	17.2	3.1	9.3	27.4	11.7	8.0	15.6	1.3	6.5	44.6	70.6
2146-3-19-5	16.7	3.3	9.9	32.9	11.3	9.0	11.4	1.2	4.4	37.0	60.8
Promedio	17.2	3.3	10.6	30.6	12.2	7.6	12.3	1.2	5.1	37.8	66.1

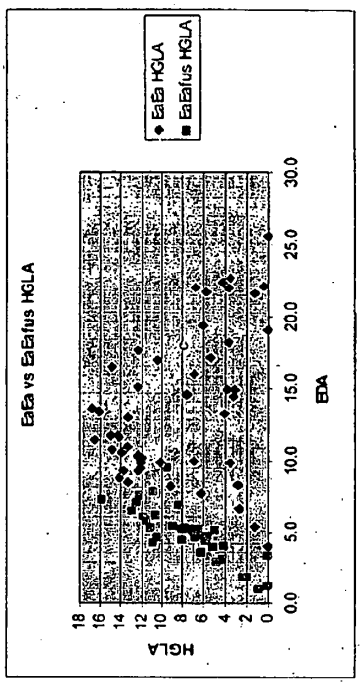
FIG. 71

FIG. 72


EgEa vs EgEafus HGLA
EgEa HGLA
EgEafus HGLA
HGLA
EDA


EgTpom vs EgTpomfus HGLA
EgTpom HGLA
EgTpomfus HGLA
HGLA
EDA

D


EaEa vs EaEafus HGLA
EaEa HGLA
EaEafus HGLA
HGLA
EDA

C

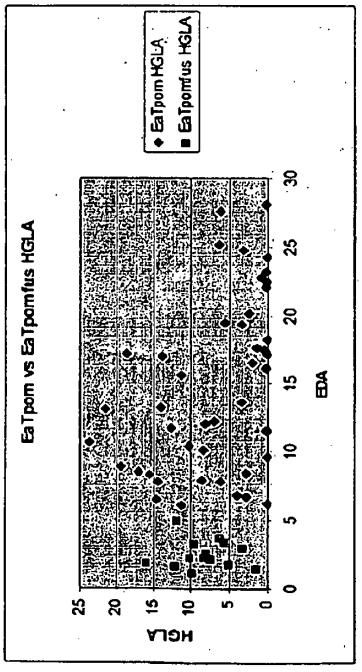

EaTpom vs EaTpomfus HGLA
EaTpom HGLA
EaTpomfus HGLA
HGLA
EDA

FIG. 73

	16:0	18:0	18:1	18:2 (5,9)	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUN	ETA	EPA	Otros	%Elo	%D8	%D5
2274-1-4-1	15.0	3.8	13.0	0.0	33.4	8.5	8.4	0.7	1.8	9.7	1.1	0.0	0.3	3.2	1.3	36.9	61.0	86.2
2274-1-4-2	14.3	3.6	14.6	0.2	31.3	7.2	9.4	0.7	2.4	10.3	1.0	0.2	0.3	3.1	1.3	40.8	60.5	83.2
2274-1-4-3	14.2	4.4	15.3	0.0	32.7	7.4	8.8	0.7	2.1	9.2	0.9	0.1	0.2	2.8	1.3	37.5	59.6	83.9
2274-1-4-4	16.0	3.1	16.7	0.0	32.0	7.8	8.9	0.7	1.6	8.1	1.0	0.2	0.2	2.7	1.1	36.1	56.0	85.6
2274-1-4-5	15.2	4.5	16.6	1.8	30.6	7.0	9.2	0.7	1.6	7.9	1.0	0.1	0.2	2.4	1.1	37.1	54.6	85.0
Promedio	14.9	3.9	15.2	0.4	32.0	7.6	8.9	0.7	1.9	9.0	1.0	0.1	0.2	2.9	1.2	37.7	58.3	84.8
2274-2-2-1	14.1	4.4	11.8	0.0	30.0	9.1	9.4	0.9	1.9	11.4	1.3	0.2	0.3	4.0	1.2	41.9	62.4	87.5
2274-2-2-2	16.2	4.1	14.6	0.0	28.3	10.5	6.6	0.7	1.6	10.1	1.1	0.2	0.2	4.3	1.5	38.1	67.7	88.6
2274-2-2-3	16.5	5.0	11.2	0.0	28.6	11.0	6.8	0.7	1.8	11.0	1.1	0.2	0.3	4.3	1.6	38.8	68.9	88.4
2274-2-2-4	14.6	4.1	14.8	0.0	30.1	8.4	7.8	0.0	3.0	10.5	1.0	0.0	0.4	3.9	1.5	40.8	66.9	80.9
2274-2-2-5	15.5	5.0	15.3	0.0	28.9	10.0	6.4	0.4	2.3	9.6	0.8	0.0	0.2	4.0	1.5	37.5	69.2	84.5
Promedio	15.4	4.5	13.5	0.0	29.2	9.8	7.4	0.5	2.1	10.5	1.1	0.1	0.3	4.1	1.5	39.4	67.0	86.0
2274-3-1-1	16.4	4.5	14.8	0.0	28.7	10.6	7.7	0.6	1.5	8.6	1.3	0.2	0.3	3.7	1.2	37.0	61.0	87.6
2274-3-1-2	16.1	5.4	14.0	0.0	31.7	10.9	7.4	0.4	1.3	7.9	1.0	0.0	0.2	2.8	1.0	32.6	59.2	87.6
2274-3-1-3	16.1	4.0	12.7	0.0	33.3	11.5	7.8	0.4	1.3	7.7	1.1	0.0	0.2	3.1	1.0	32.0	57.9	88.1
2274-3-1-4	16.1	4.2	10.1	0.0	28.4	9.0	8.9	0.9	2.0	12.6	1.2	0.3	0.3	4.7	1.4	44.3	66.2	88.3
2274-3-1-5	16.1	4.5	10.7	0.0	36.8	13.8	5.7	0.5	0.6	5.9	1.1	0.0	0.4	3.1	0.7	25.0	59.3	89.8
Promedio	16.2	4.5	12.4	0.0	31.8	11.1	7.5	0.6	1.3	8.5	1.1	0.1	0.3	3.5	1.1	34.2	60.7	88.3
2274-3-3-1	15.1	3.4	15.9	0.0	30.5	9.5	6.3	0.5	2.5	9.1	1.0	0.2	0.3	4.0	1.8	36.7	68.7	82.3
2274-3-3-2	14.9	4.4	16.4	1.7	28.9	8.3	7.1	0.5	2.7	8.9	0.9	0.1	0.3	3.3	1.6	38.5	65.4	80.3
2274-3-3-3	14.7	2.9	13.3	0.2	30.9	9.8	7.1	0.5	2.7	10.6	1.0	0.1	0.3	3.9	1.7	38.8	68.4	82.7
2274-3-3-4	14.0	4.8	17.0	1.8	28.1	6.8	8.2	0.6	2.6	9.8	0.8	0.1	0.3	3.4	1.6	41.9	64.2	82.0
2274-3-3-5	14.1	3.6	16.2	0.3	29.4	8.4	7.3	0.0	3.8	10.0	0.9	0.1	0.3	3.6	1.8	40.8	68.4	76.6
Promedio	14.5	3.8	15.8	0.8	29.6	8.6	7.2	0.4	2.9	9.7	0.9	0.1	0.3	3.7	1.7	39.3	67.0	80.8
2274-5-4-1	15.3	4.6	14.9	0.0	30.4	12.1	6.0	0.0	2.4	7.4	0.9	0.0	0.3	3.4	2.2	32.5	66.2	80.1
2274-5-4-2	17.3	3.7	10.1	0.0	40.0	18.2	4.1	0.2	0.4	2.5	0.9	0.0	0.1	1.7	1.0	14.2	48.2	89.3
2274-5-4-3	15.9	5.4	14.7	0.0	28.8	10.1	6.0	0.0	3.2	9.2	0.7	0.0	0.3	3.8	2.0	37.4	71.0	78.8
2274-5-4-4	15.2	4.4	18.1	0.3	27.4	9.0	5.5	0.0	3.7	9.4	0.8	0.0	0.5	3.8	1.9	39.5	73.5	75.9
2274-5-4-5	15.3	5.4	14.3	0.0	31.5	12.1	5.3	0.0	2.5	7.3	0.7	0.0	0.3	3.2	2.1	30.6	68.9	79.2
Promedio	15.8	4.7	14.4	0.1	31.6	12.3	5.4	0.0	2.4	7.2	0.8	0.0	0.3	3.2	1.8	30.8	65.6	80.7

ES 2 559 312 T3

FIG. 74

Caso	Composición de los ácidos grasos (% en peso)									% de elong. delta-9 en C18	% de desat. delta-8 en C20
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2275-1-1-1	13.5	2.3	13.8	33.8	9.8	6.9	15.0	0.9	4.0	38.0	70.7
2275-1-1-2	13.5	2.6	13.9	32.3	8.1	6.8	17.1	1.0	4.7	42.2	73.6
2275-1-1-3	15.1	3.2	11.5	35.8	11.5	5.9	12.5	0.9	3.5	32.5	70.2
2275-1-1-4	15.8	3.3	11.8	32.9	10.4	6.7	14.1	1.0	4.0	37.3	70.1
2275-1-1-5	13.7	2.5	16.9	36.2	11.6	4.8	10.4	0.8	3.2	28.6	70.7
Promedio	14.3	2.8	13.6	34.2	10.3	6.2	13.8	0.9	3.9	35.7	71.1
2275-1-2-1	13.8	2.8	16.5	30.6	7.6	8.6	14.5	1.2	4.4	42.9	66.1
2275-1-2-2	13.4	2.4	12.8	31.9	8.6	9.9	15.2	1.3	4.5	43.3	63.7
2275-1-2-3	13.9	2.9	13.4	33.0	9.3	9.7	12.6	1.3	3.9	39.3	60.2
2275-1-2-4	14.6	3.2	10.9	31.8	10.1	9.1	14.5	1.3	4.4	41.3	64.4
2275-1-2-5	13.2	2.6	11.5	32.4	10.2	9.0	15.0	1.4	4.7	41.3	65.5
Promedio	13.8	2.8	13.0	31.9	9.2	9.3	14.4	1.3	4.4	41.6	64.0
2275-3-4-1	16.5	3.3	16.7	32.0	9.7	6.0	12.0	0.9	3.0	34.4	68.6
2275-3-4-2	17.3	3.7	14.8	34.9	11.5	6.5	8.0	1.0	2.3	27.8	57.6
2275-3-4-3	17.7	3.6	15.2	33.9	10.6	6.8	8.8	1.1	2.3	30.0	58.2
2275-3-4-4	15.7	4.0	13.8	32.3	9.8	8.3	12.0	1.1	2.9	36.6	61.0
2275-3-4-5	17.8	3.1	10.5	34.5	10.8	8.0	11.3	1.2	2.8	34.0	60.7
Promedio	17.0	3.5	14.2	33.5	10.5	7.1	10.4	1.1	2.7	32.5	61.2
2275-3-8-1	16.3	3.9	12.5	32.9	10.4	5.8	13.7	1.3	3.3	35.8	70.8
2275-3-8-2	16.6	5.1	14.3	30.4	8.7	7.7	12.7	1.3	3.1	38.8	63.8
2275-3-8-3	16.0	5.0	14.8	30.8	8.5	6.8	13.8	1.1	3.2	38.7	68.5
2275-3-8-4	16.6	4.5	12.9	30.3	8.4	7.4	15.4	1.1	3.6	41.5	69.3
2275-3-8-5	17.6	4.0	12.0	32.3	10.6	5.6	13.1	1.0	3.7	35.4	71.8
Promedio	16.6	4.5	13.3	31.3	9.3	6.6	13.8	1.1	3.4	38.1	68.8
2275-6-1-1	16.0	4.4	19.0	28.6	8.5	6.5	12.2	1.3	3.6	38.8	66.9
2275-6-1-2	15.2	4.2	19.4	29.2	9.0	6.4	12.1	1.3	3.2	37.6	66.6
2275-6-1-3	16.1	3.3	15.4	29.6	9.6	6.7	14.2	1.1	4.1	39.9	70.1
2275-6-1-4	15.8	3.8	19.8	29.5	8.0	6.8	11.8	1.4	3.1	38.1	64.7
2275-6-1-5	15.2	3.8	20.3	27.6	7.6	6.8	13.4	1.5	3.8	42.0	67.6
Promedio	15.7	3.9	18.8	28.9	8.5	6.6	12.7	1.3	3.6	39.3	67.2