

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 631**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2014** **E 14305673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017** **EP 2942390**

54 Título: **Microalgas verdes que carecen del gen funcional DYRKP-1, para uso en el aumento de la producción de materias primas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2017

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SCHULZ-RAFFELT, MIRIAM;
CHOCHOIS, VINCENT;
YONGHUA, LI-BEISSON y
PELTIER, GILLES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 631 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Microalgas verdes que carecen del gen funcional DYRKP-1, para uso en el aumento de la producción de materias primas

5 La presente invención se refiere al campo de las microalgas verdes y su uso en biotecnología. Más en particular, la presente invención describe el uso de *Chlamydomonas* que carecen de una proteína DYRKP-1 funcional, para producir grandes cantidades de lípidos neutros (triacilglicéridos: TAGs, o aceites) y/o grandes cantidades de almidón, bajo condiciones de estrés.

10 Debido a la alta productividad de biomasa y a su capacidad de acumular elevadas cantidades intracelulares de almidón (convertible en bioetanol) o de aceite (convertible en biodiesel), las microalgas representan una prometedora materia prima para la producción de biocombustibles de próxima generación (Hu et al., 2008 Wijffels y Barbosa, 2010). Sin embargo, es preciso que su productividad aumente para alcanzar una producción sostenible de biocombustibles (Delrue et al., 2013).

15 Las microalgas y, más generalmente los organismos fotosintéticos, han desarrollado sofisticadas estrategias para optimizar el crecimiento y la supervivencia bajo condiciones constantemente fluctuantes de luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes. En las microalgas, la privación de macronutrientes esenciales afecta en gran medida al crecimiento e induce cambios drásticos en el metabolismo celular. Una respuesta general a la privación de nitrógeno o azufre consiste en una disminución de la síntesis de proteínas, una detención en la división celular, una acumulación masiva de compuestos de almacenamiento ricos en energía, tales como almidón y triacilgliceroles (Ball et al., 1990; Merchant et al., 2012) y una regulación a la baja de la fotosíntesis (Grossman, 2000, Peltier y Schmidt, 20 1991). Este requisito de privación de nutrientes para desencadenar la acumulación de compuestos de reserva es una de las principales limitaciones biológicas de las microalgas para fines biotecnológicos, ya que afecta a la productividad de la biomasa (Hu et al., 2008). A pesar del considerable interés por las microalgas como nueva materia prima (Larkum et al., 2012), se sabe poco sobre los genes de señalización y reguladores que controlan los 25 procesos de conversión y almacenamiento de energía fotosintética en relación con el estatus nutricional y energético.

La decodificación de los mecanismos reguladores que controlan el crecimiento, la fotosíntesis y la acumulación de reservas en respuesta al estatus de los nutrientes y la energía es por lo tanto una cuestión clave para optimizar la productividad de microalgas para aplicaciones biotecnológicas.

30 Con el objetivo de descifrar los mecanismos reguladores implicados en la dinámica de reserva en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, los autores de la presente invención han caracterizado ahora un mutante de *Chlamydomonas reinhardtii*, cribado en un déficit en la degradación del almidón y llamado *std1* (de starch degradation). El mutante *std1* alberga una inserción en un gen de la familia de DYRK, inicialmente anotado como *DYRK2* (genoma de *Chlamydomonas* versión 4.0), y renombrado en el presente texto *DYRKP-1*. El mutante de *Chlamydomonas std1*, el primer mutante *dyrk* del linaje verde publicado hasta ahora, acumula mucho más almidón y 35 aceite que su progenitor de tipo silvestre en respuesta a la privación de nutrientes en condiciones fotoautótrofas y más aceite que su progenitor de tipo silvestre en respuesta a la privación de nutrientes también en condiciones mixotróficas. Por tanto, la presente invención proporciona métodos para cultivar células de microalgas para optimizar su crecimiento para una producción óptima de almidón y/o lípidos de las microalgas. Los métodos de la presente invención inducen y potencian la acumulación de almidón y/o aceite, dependiendo de las condiciones de cultivo, 40 dentro de las células de microalgas. Los métodos descritos son adecuados para la producción a gran escala de microalgas ricas en almidón y/o aceite.

Un primer aspecto de la presente invención es por tanto un método para producir materia prima de biomasa, que comprende las etapas de:

45 (i) cultivar células de microalgas verdes en las que la expresión y/o la actividad de la proteína DYRKP-1 de secuencia SEQ ID N° 1 está disminuida, pudiéndose obtener dicha disminución silenciando, rebajando, mutando y/o interrumpiendo el gen DYRKP-1 o inhibiendo la actividad de la proteína DYRKP-P mediante compuestos químicos que actúan como inhibidores específicos; y

50 (ii) inducir la acumulación de reservas y/o el aumento en la producción de biomasa por dichas microalgas, que comprende incubar las células de microalgas en un medio deficitario, siendo deficitario dicho medio deficitario en al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en nitrógeno, azufre y fósforo.

Como se define en el presente texto, la "proteína DYRKP-1" es una proteína DYRK expresada por microalgas, que posee una caja DH que tiene la siguiente secuencia: H(R/K) TGFEEXK (D/E/N) (F/L) (SEQ ID N°: 3). La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante (secuencia de cDNA que incluye los 5' y 3' - UTRs) de la proteína 55 DYRKP-1 de *Chlamydomonas reinhardtii* se describen en el presente texto (SEQ ID N°: 1 y 2, respectivamente). A partir de estas secuencias, un experto en la técnica puede identificar perfectamente la secuencia de DYRKP-1 en cualquier microalga verde.

5 En el presente texto, "alterado" significa que se cambia la expresión y/o la actividad de la proteína DYRKP-1, de forma que la actividad de la proteína desciende. Por ejemplo, el gen *DYRKP-1* puede ser silenciado, desactivado, mutado y/o interrumpido, de modo que las microalgas carecen de una proteína funcional DYRKP-1. La actividad de la proteína DYRKP-P podría ser también inhibida por compuestos químicos que actúan como inhibidores específicos.

Como se describe en la parte experimental que sigue, el método según la invención puede llevarse a cabo con *Chlamydomonas*, especialmente con *Chlamydomonas reinhardtii*.

10 En la etapa (i), las células se cultivan de acuerdo con cualquier protocolo habitual conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden cultivar fotoautótroficamente en un medio mínimo tamponado con MOPS (MM) al que se suministra 2% de CO₂ a una densidad de 2 - 5 x 10⁶ células/ml.

15 En una realización particular de este aspecto, dicha acumulación de reserva inductora comprende incubar las células de microalgas en un medio deficitario, es decir, un medio que no comprende, en cantidades suficientes, todos los nutrientes requeridos para un crecimiento óptimo de microalgas verdes. Entre los ejemplos de tal medio deficitario se incluyen un medio deficitario en al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en nitrógeno, azufre y fósforo, en una forma que puede ser metabolizada por las microalgas. Por supuesto, la frase "deficitario en" no se ha de leer en un sentido absoluto (es decir, con una concentración igual a cero), sino que significa que la concentración de dicho nutriente en el medio está muy por debajo (por lo menos 10 veces por debajo) de la concentración de dicho nutriente en un medio clásico usado para el cultivo de microalgas.

20 Entre la etapa (i) y la etapa (ii), las células pueden ser recolectadas y transferidas al medio deficitario. Alternativamente, típicamente en un dispositivo de cultivo continuo, el déficit en el medio es creado por el metabolismo de las células, en ausencia de adición exógena de al menos un nutriente. Por ejemplo, como se ilustra en la parte experimental y en la Fig. 9A, la adición de un medio mínimo libre de N en un fotobiorreactor que trabaja como turbidostato (para mantener la biomasa celular a un nivel constante) dio como resultado una disminución del contenido de amoníaco del medio de cultivo, que se agotó completamente en menos de 2 días.

25 En una realización particular, la etapa de inducir acumulación de reserva comprende iluminar las células de microalgas con una luz que permite que tenga lugar la fotosíntesis.

30 Por ejemplo, esta iluminación puede realizarse a una intensidad de al menos 25 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o al menos 100 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por ejemplo comprendida entre 25 y 2000 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 8 a 24 horas al día. Un experto en la técnica sabe perfectamente que los efectos de la intensidad de la luz dependen de hecho de la intensidad que realmente recibe la microalga, y por tanto dependen de diversos parámetros tales como la densidad celular y la forma del fotobiorreactor, etc., y es capaz de adaptar la intensidad de la iluminación a las condiciones específicas encontradas.

35 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han demostrado que la privación de nutrientes no conduce a una parada rápida de la fotosíntesis por microalgas que carecen de actividad de DYRKP-1, como es normalmente el caso de las microalgas de tipo silvestre. Esto es particularmente ventajoso, ya que las células no sólo pueden ser enriquecidas con aceite y/o almidón, sino que además la biomasa global aumenta durante varios días de condiciones deficitarias, dando lugar a un notable aumento global de la productividad de lípidos y almidón.

40 Por tanto, en una realización ventajosa de la presente invención, la etapa de incubar las células de microalgas en un medio deficitario dura por lo menos 24 horas, por ejemplo de 2 a 8 días, preferiblemente de 3 a 6 días. Por supuesto, el crecimiento celular en un medio deficitario depende mucho de las condiciones experimentales, particularmente de la densidad celular, y por tanto un experto en la técnica adaptará la duración de la incubación con un medio deficitario de forma que, en las condiciones específicas utilizadas, la acumulación de reserva y/o el aumento de la biomasa sean óptimos.

45 De acuerdo con una realización particular de la invención, la etapa (ii) comprende incubar las células de microalgas en un medio que comprende carbono orgánico tal como, por ejemplo, acetato. De acuerdo con un ejemplo no limitante de tales condiciones mixotróficas, ilustradas en los ejemplos que siguen, las células se incuban en la etapa (ii) durante 2 a 6 días en un medio deficitario en nitrógeno que comprende acetato, bajo iluminación constante de al menos 50 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los autores de la presente invención han demostrado que, en condiciones mixotróficas, las microalgas que carecen de actividad de DYRKP-1 responden al agotamiento de nutrientes aumentando la acumulación de lípidos en comparación con las células de tipo silvestre. Por tanto, esta realización particular del método se utiliza ventajosamente para producir aceite, por ejemplo para la producción de biodiesel.

50 De acuerdo con otra forma de realización, la etapa inductora (ii) comprende incubar las células de microalgas en un medio deficitario como se ha definido anteriormente y en condiciones fotoautótrofas, es decir, en condiciones tales que convierten energía radiante en energía biológicamente útil y sintetizan compuestos metabólicos usando solamente dióxido de carbono, bicarbonato o carbonatos como fuente de carbono. Típicamente, las células de microalgas se incuban bajo iluminación en un medio esencialmente carente de carbono orgánico que pueden metabolizar. En lo que precede, "esencialmente carente de carbono orgánico" significa que ningún carbono orgánico

que pueda ser metabolizado por las microalgas ha sido añadido al medio. De acuerdo con una versión preferida de esta realización, las células se incuban en la etapa (ii) durante al menos 15 horas, preferiblemente al menos 1, 2 ó 3 días y hasta 6 o más días en un medio deficitario en nutrientes, por ejemplo en un medio deficitario en nitrógeno esencialmente carente de carbono orgánico que puede ser metabolizado por las microalgas. Los inventores han demostrado que en condiciones fotoautótrofas, las microalgas que carecen de actividad de DYRKP-1 acumulan mucho más almidón y aceite que sus progenitoras de tipo silvestre en respuesta a la privación de nutrientes. Por tanto, esta forma de realización particular del método se utiliza ventajosamente para producir almidón, por ejemplo para la producción de bioetanol, así como para producir aceite, por ejemplo para la producción de biodiesel. Esta realización es particularmente interesante porque, en condiciones fotoautótrofas, las células pueden satisfacer completamente su necesidad de carbono a través de la fotosíntesis, lo cual es una ventaja importante en comparación con las células que requieren una fuente de carbono suministrada adicionalmente para el crecimiento (tal como levadura o *E. coli*).

Se ha de tener en cuenta que las microalgas producen de forma natural grasas poliinsaturadas (omega-3 y omega-6), así como moléculas complejas tales como carotenoides, y que estos productos de alto valor pueden producirse también de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Por tanto, la invención se refiere también a métodos para producir ácidos grasos, grasas poliinsaturadas, carotenoides y otros compuestos para las industrias cosmética y/o farmacéutica, así como complementos alimenticios, los cuales métodos comprenden una etapa de acumulación de almidón y/o triacilgliceroles en microalgas, llevando a cabo un procedimiento como el descrito anteriormente.

Los métodos de la invención pueden comprender una o más etapas de extracción después de desencadenar la etapa de acumulación de almidón y/o triacilgliceroles en microalgas. La etapa de extracción puede implementarse usando disolventes u otro método de extracción bien conocido por los expertos en la técnica.

La presente invención se entenderá con más claridad por medio de la descripción adicional que sigue, que se refiere a ejemplos que ilustran la respuesta de microalgas que carecen de actividad de DYRKP-1, ante la privación de nutrientes, así como a las figuras adjuntas.

Leyendas de las figuras.

Figura 1: Aislamiento y caracterización molecular del mutante de *Chlamydomonas std1* afectado en el gen *DYRKP-1*.

(A) Fenotipo de degradación del almidón del mutante *std1*. Las colonias algales se motearon en filtros de papel sobre TAP-agar agotado en N o S durante 5 días, dando lugar a la acumulación de almidón, y luego se colocaron en la oscuridad sobre medio mínimo (MM) durante dos días para inducir la degradación del almidón. La acumulación de almidón se visualizó mediante la exposición a vapor de yodo.

(B) El modelo del gen *DYRKP-1* de *Chlamydomonas* se compone de 14 exones (cajas negras) y 13 intrones (líneas negras). La información de la secuencia sobre los límites exón-intrón y el inicio 5' se obtuvo a partir de tres RT-PCRs solapantes. La inserción de la casete de resistencia a la paromomicina (gen *AphVIII*, caja blanca) en el tercer exón de *DYRKP-1* se determinó mediante PCR de *walking* de genoma.

(C) La expresión del gen *DYRKP-1* analizada mediante RT-PCR en cepas de tipo silvestre, *std1* y dos cepas complementadas (*std1* :: STD1 1 y 2) cultivadas en TAP. Se usó actina como gen testigo o de control.

(D) Expresión de la proteína DYRKP-1 analizada mediante inmuno-detección en lisados de proteínas solubles de células cultivadas fotoautótrofamente separadas en un gel de SDS-poliacrilamida al 8%.

(E) Acumulación de transcripto de *DYRKP-1* en respuesta a la privación de N. Las cepas de tipo silvestre, mutantes *std1* y complementadas *std1*:: STD1 1 y 2 fueron privadas de nitrógeno durante tres días en condiciones fotoautótrofas. El ARN se hibridó con sondas que codifican un fragmento de *DYRKP-1*; el gen *CBLP2* que sirvió como testigo de carga.

Figura 2: Análisis de transferencia Southern y complementación de mutante.

(A) Análisis de transferencia Southern de la cepa de tipo silvestre 137AH y cepa mutante *std1*. Se cargó en un gel de agarosa ADN genómico restringido con *NotI*-, *XmaI* o *StuI/SacI*-, se sometió a transferencia Southern y se hibridó con una sonda contra el gen *AphVIII* (casete de resistencia a la paromomicina). La cantidad de ADN cargada por pista se indica en µg.

(B) Construcción del plásmido para la complementación de *std1* con marcador de resistencia a la higromicina. Se amplificó por PCR ADN genómico de tipo silvestre que codifica *STD1* y fue clonado en el vector pSL-Hyg que emergió de pSL18.

5 (C) Niveles de almidón de cepa de tipo silvestre (137AH, en negro), cepa de mutante *std1* (blanco) y dos cepas complementadas (*std1* :: STD1 1 y 2, en gris) en diferentes condiciones de privación. Los cultivos se desarrollaron en medio TAP (Con. = Control), sometidos durante dos días a la carencia de nitrógeno (TAP-N) o de azufre (TAP-S), lo que indujo la acumulación de almidón (Acc.). A continuación los cultivos agotados se centrifugaron, se resuspendieron en medio mínimo (MM) y se mantuvieron durante 8 ó 24 horas en la oscuridad. En MM (que comprende N pero no C) en la oscuridad se catabolizará el almidón (Degr.). Los valores de almidón son las medias de al menos 3 replicados biológicos \pm SD.

Figura 3: Árbol filogenético de la familia de proteínas DYRK incluyendo el linaje verde.

10 (A) Árbol filogenético de la familia de proteínas DYRK. Las secuencias de aminoácidos homólogos de algas, hongos y plantas recuperadas de bases de datos JGI, Phytozome o NCBI se compararon llevando a cabo un análisis filogenético. Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT versión 6. El árbol se obtuvo con el método neighbor-joining (método del vecino más cercano). Se utilizaron las siguientes abreviaturas: Asp: *Aspergillus fumigatus*, At: *Arabidopsis thaliana*, d: *Drosophila melanogaster*, Dd: *Dictyostelium discoideum*, ChINC: *Chlorella sp. NC64A*, Cre: *Chlamydomonas reinhardtii*, Micpu: *Micromonas pusilla (CCMP1545/sp. RCC299)*, Os: *Oryza sativa*, 15 Ost: *Ostreococcus (lucimarinus/tauri)*, Phypa: *Physcomitrella patens*, Vca: *Volvox carteri*, Viv: *Vitis vinífera* (se combinaron secuencias de *Zea mays* con homólogos de arroz y con vino). Los números de registro de las secuencias DYRK y la multi-alineación usados para construir el árbol filogenético se muestran en la Tabla 1.

20 (B) Secuencia de consenso de la homología de DYRK (DH) - caja de seis subgrupos de DYRK de acuerdo con la Figura 3A; en el subgrupo DYRKP se distinguieron tres subgrupos menores que daban las siete clases siguientes: DYRK1 (7 secuencias), DYRK2 (22 secuencias), YAK1 (21 secuencias), DYRKP-A (12 secuencias de plantas superiores incluyendo musgo), DYRKP-B (11 secuencias de plantas superiores), DYRKP-algas (7 secuencias) y la secuencia de consenso DH publicada (Becker y Joost, 1999), en la que se compararon nueve secuencias de diferentes grupos DYRK.

25

Nombre	Grupo	Especie	número de registro	NCBI	aa predicho
DYRK1A	DYRK1	<i>Homo sapiens</i>	NP_001387; GI:18765758		763
DYRK1B	DYRK1	<i>Homo sapiens</i>	NP_004705; GI:4758222		629
DYRK2	DYRK2	<i>Homo sapiens</i>	NP_006473; GI:153281169		601
DYRK3	DYRK2	<i>Homo sapiens</i>	NP_003573; GI:51702240		588
DYRK4	DYRK2	<i>Homo sapiens</i>	NP_003836; GI:28827774		520
DYRK1A	DYRK1	<i>Mus musculus</i>	NP_031916; GI:24418935		763
DYRK1B	DYRK1	<i>Mus musculus</i>	NP_001033046; GI:83816922		629
DYRK2	DYRK2	<i>Mus musculus</i>	NP_001014412; GI:67846105		599
DYRK3	DYRK2	<i>Mus musculus</i>	NP_663483; GI:21704000		586
DYRK4	DYRK2	<i>Mus musculus</i>	NP_001028487; GI:161333817		616
Minibrain (dDyrk1)	DYRK1	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_728104; GI:24642876		908
dDyrk2 (Smi35A)	DYRK2	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_523564; GI:17737415		722
dDyrk3	DYRK2	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001033810; GI:85724756		828
DYRK1B (Dyrk1b)	DYRK1	<i>Danio rerio</i>	NP_001161737; GI:319996595		681
DYRK2	DYRK2	<i>Danio rerio</i>	NP_001038298.1 GI:113677529		587
DYRK4	DYRK2	<i>Danio rerio</i>	XP_693389; GI:189537435		634
DYRK3	DYRK2	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001088793; GI:148224808		567
YakA	Yak	<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_638920; GI:66810395		1458
DdDyrk1	DYRK1	<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_642598; GI:66817490		836
DdDyrk2	DYRK2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_628965; GI:66800079		915
Yak1p	Yak	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012394; GI:6322320		807
Pom1	Pom/DYRK2	<i>Neurospora crassa</i>	XP_960871; GI:85099941		1300
Pom1	Pom/DYRK2	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	XP_001940188; GI:189207709		545
Ppk15p	Yak	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593830; GI:19114742		534
Pom1 (Pom1p)	Pom/DYRK2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_592974; GI:19113886		1087
Ppk5p	Pom/DYRK2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593081; GI:63054495		836
AspYak1	Yak	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_746572; GI:70982087		894

Nombre	Grupo	Especie	Modelo de gen	Número de registro NCBI	aa predicho	Sitio web del genoma
AtYak1	Yak	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G35980	NP_198447; GI:42568145	956	http://www.arabidopsis.org
AiDYRKP-1	DYRKP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G73450	NP_177487; GI:42563202	1152	
AiDYRKP-2	DYRKP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G73460	NP_177488; GI:42563204	1169	
AiDYRKP-3	DYRKP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G40120	NP_181541; GI:15225633	570	
AiDYRKP-4	DYRKP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G17750	NP_188402; GI:15229515	1138	
OsYak1	Yak	<i>Oryza sativa ssp japonica</i>	Os02g0702500	NP_001047851; GI:115448143	813	http://rice.plantbiology.msu.edu
OsYak2	Yak	<i>Oryza sativa ssp japonica</i>	Os04g0602800	NP_001053776; GI:115460352	924	http://www.phytozome.org
OsDYRKP-1	DYRKP	<i>Oryza sativa ssp japonica</i>	Os01g0832900	NP_001044708; GI:115440857	729	
OsDYRKP-2	DYRKP	<i>Oryza sativa ssp japonica</i>	Os03g0719500	NP_001051095; GI:115454989	1115	
OsDYRKP-3	DYRKP	<i>Oryza sativa ssp japonica</i>	Os05g0466900	NP_001055789; GI:297604629	708	
VvYak1	Yak	<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVG01024260001	XP_002267912.1; GI:225454595	909	http://www.phytozome.org
VvDYRKP-1	DYRKP	<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVG01012107001	XP_002276420.1; GI:225423662	1855	
VvDYRKP-2	DYRKP	<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVG01032814001	XP_002272072.1; GI:225448445	728	
ZmYak1	Yak	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G156638	NP_001159228.1; GI:259490627	706	(incomplete)
ZmYak2	Yak	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G311051	ACL59420.1; GI:219886091	556	(incomplete)
ZmDYRKP-1	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G015073	no encontrado	1103	http://www.maizesequence.org
ZmDYRKP-2	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G181002	no encontrado	1098	http://www.phytozome.org
ZmDYRKP-3	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G068192	NP_001145942.1; GI:226530085	391	
ZmDYRKP-4	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G088409	NP_001182917.1; GI:308081613	684	
ZmDYRKP-5	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G357873	NP_001130373.1; GI:212275250	724	
ZmDYRKP-6	DYRKP	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G448633	NP_001148168.1; GI:226506060	725	
PhyYak1	Yak	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s3_592V6.1	no completados los modelos	959	http://www.cosmos.org
PhyYak2	Yak	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s16_333V6.1	génicos en NCBI	1064	http://www.phytozome.org
PhyYak3	Yak	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s132_192V6.1		1108	
PhyYak4	Yak	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s192_46V6.1		1089	
PhyYak5	Yak	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s401_7V6.1		1136	
PhyDYRKP2	DYRKP	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s252_88V6.1		1129	
PhyDYRKP-1	DYRKP	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s47_312V6.1		726	
PhyDYRKP-2	DYRKP	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s312_23V6.1		525	
PhyDYRKP-3	DYRKP	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp1s381_39V6.1		1446	
PopitYak1	Yak	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0013s07280	EEE95157.1; GI:222857610	966	http://www.phytozome.org
PopitYak2	Yak	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0019s06030	EEF00267.1; GI:222862760	893	
PopitDYRKP-1	DYRKP	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0008s06890	EEE89528.1; GI:222851981	725	
PopitDYRKP-2	DYRKP	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0010s19570	EEF01327.1; GI:222864196	591	
PopitDYRKP-3	DYRKP	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0012s03670	EEE96543.1; GI:222858996	1158	
PopitDYRKP-4	DYRKP	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0015s05140	EEF07789.1; GI:222870658	1151	

Nombre	Grupo	Especie	Modelo de gen	Número de registro NCBI	aa predicho	Sitio web del genoma
CreYak1	Yak	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre08.g381950	XP_001694330; GI:159472382	2202	http://www.phytozome.org
CreDYRK2	DYRK2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre02.g146500	XP_001695011; GI:159473779	1239	
CreDYRKP-1	DYRKP	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre07.g337300	XP_001700085; GI:159484074	1278	
VcaYak1	Yak	<i>Volvox carteri</i>	Volca1 30949	XP_002953068; GI:302843051	398 (incompleto)	http://www.phytozome.org
VcaDYRK2	DYRK2	<i>Volvox carteri</i>	Volca1 61790	XP_002951959; GI:302840826	512	
VcaDYRKP-1	DYRKP	<i>Volvox carteri</i>	Volca1 77582	XP_002957430; GI:302851815	370	
OstluYak1	Yak	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	Ost9901_3 37908	XP_001420045; GI:145351353	425	http://genome.jgi.doe.gov
OstluDYRKP-1	DYRKP	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	Ost9901_3 36819	XP_001417467; GI:145345962	395	
Ostlu38674	DYRK2?	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	Ost9901_3 38674	XP_001418004; GI:145347077	397 (incompleto)	
Ostlu42173	DYRK1?	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	Ost9901_3 42173	XP_001422264; GI:145356070	154 (incompleto)	
OstaYak1	Yak	<i>Ostreococcus tauri</i>	Osta4 19878	XP_003081795; GI:308808970	772	http://genome.jgi.doe.gov
OstaDYRKP-1	DYRKP	<i>Ostreococcus tauri</i>	Osta4 16877	XP_003078697; GI:308802768	652	
Osta17596	DYRK2?	<i>Ostreococcus tauri</i>	Osta4 17596	XP_003079347; GI:308804069	837 (incompleto)	
Osta22490	DYRK1?	<i>Ostreococcus tauri</i>	Osta4 22490	XP_003084217; GI:308813822	472 (incompleto)	
ChINC-DYRK2	DYRK2	<i>Chlorella sp. NC64A</i>	ChINC64A_1 16563	EFN52309; GI:307104053	364 (incompleto)	http://genome.jgi.doe.gov
ChINC-DYRKP-1	DYRKP	<i>Chlorella sp. NC64A</i>	ChINC64A_1 36965	EFN52148; GI:307103891	285 (incompleto)	
MicpuC-Yak1	Yak	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	MicpuC3 39551	XP_003057930; GI:303272723	605	http://genome.jgi.doe.gov
MicpuC-DYRK2	DYRK2	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	MicpuC3 152430	XP_003057384; GI:303276180	513	
MicpuC-DYRKP-1	DYRKP	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	MicpuC3 16074	XP_003058010; GI:30327433	341	
MicpuC8718	DYRK1?	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	MicpuC3 8718	XP_003057290; GI:303275992	143 (incompleto)	
MicpuN-Yak1	Yak	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	MicpuN3 83368	XP_002503782; GI:255080404	421	http://genome.jgi.doe.gov
MicpuN-DYRK2	DYRK2	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	MicpuN3 58615	XP_002502528; GI:255077896	642	
MicpuN-DYRKP-1	DYRKP	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	MicpuN3 58100	XP_002501491; GI:25507563	1019	
MicpuN85819	DYRK1?	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	MicpuN3 85819	XP_002508509; GI:255083869	238 (incompleto)	

Tabla 1: Números de registro para las secuencias usadas para el árbol filogenético en la Figura 2.

Las secuencias en gris no se utilizaron para la alineación. Están indicados los modelos de genes definitivamente incompletos. Cuando el número predicho de aminoácidos difería en dos bases de datos comparadas del genoma, normalmente se elegía la versión más larga. Algunos genes tienen diferentes variantes de ajuste, p. ej. "ZmDYZRKP3" que alberga tres transcripciones en este locus. En el caso de *Danio rerio* y *Xenopus laevis*, no se proporcionaron para la alineación todos los genes *DYRK* existentes.

Figura 4: Almacenamiento de carbono y actividad fotosintética en el mutante *std1* en respuesta a la privación de nitrógeno. Se cultivaron células en TAP o medio mínimo con 2% de CO₂ en aire, bajo una iluminación constante de 100 μmoles de fotones m⁻² s⁻¹. El día 0 las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en TAP-N (paneles de la izquierda A-C) o MM-N (paneles de la derecha A-C). Las mediciones se realizaron en mutante *std1* de tipo silvestre (WT), y en dos cepas complementadas *std1* :: STD1 1 y *std1* :: STD1 2 (A-C).

(A) Acumulación intracelular de almidón. Se muestran las medias de 4 experimentos (3 para el día 6) ± SD para TAP-N y medias de 6 experimentos (3 para el día 10) ± SD para MM-N.

(B) Acumulación intracelular de lípidos neutros (TAGs). Tras la extracción de lípidos celulares totales, los TAGs se separaron por cromatografía en capa fina y se cuantificaron. Se muestra un experimento representativo de tres replicados biológicos para cada condición (TAP-N o MM-N). Los valores de TAG son la media de tres replicados técnicos ± SD.

(C) La tasa de transporte de electrones fotosintéticos (ETR) se determinó a partir de medidas de fluorescencia de clorofila durante los tres primeros días de privación de N. Los valores representados son la media de 4 (TAP-N) o 6 (MM-N) medidas ± SD bajo iluminación actínica de ~ 100 μmol de fotones m⁻² s⁻¹.

(D) Inmunodetección de proteínas de interés. Los extractos de proteína de células enteras se analizaron por inmunodetección después de 1, 2 ó 6 días de agotamiento de nitrógeno en condiciones fotoautótrofas (MM-N). Las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie para controlar la carga (Figura 7C) o se inmunotransfirieron para detectar las proteínas indicadas.

Figura 5: Almacenamiento de almidón intracelular y actividad fotosintética en cultivos desarrollados fotoautótrofamente sometidos a privación de N o privación de S.

En el día 0, se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron cultivos desarrollados fotoautótrofamente (MM, 2% de CO₂ en aire) de cepas de tipo silvestre (WT), mutante (*std1*) y dos complementadas (*std1* :: STD1 1 y 2) en MM-N o MM-S en presencia de 2% de CO₂ en aire. En diferentes momentos, se analizaron los pélets de células, el volumen celular total y la biomasa en peso seco.

(A) La dinámica del almidón en la privación autotrófica de N y (B) la privación autotrófica de S a intensidades bajas de luz de 30 - 40 μmol de fotones m⁻² s⁻¹. Los valores de almidón son las medias de 5 replicados biológicos ± SD y medias de 3 experimentos para las cepas de la progenie *std1* 1A y 2A que resultan de un retrocruzamiento de *std1* (*mt-nit1 nit2*) con el tipo silvestre CC125 (*mt + nit1 nit2*), ambos son del tipo cepa "137c". Se realizaron cuatro experimentos en MM-N / CO₂ a bajas intensidades de luz de 30 - 40 μmol de fotones m⁻² s⁻¹.

(C) Eficiencias fotosintéticas de células de tipo silvestre, mutantes *std1* y complementadas durante los tres días de privación de N en condiciones autotróficas de ~ 35 μE m⁻² s⁻¹ o (D) privación de S a 100 μE m⁻² s⁻¹. Los valores trazados son la media de 5 mediciones ± SD a una iluminación de ~ 100 μE m⁻² s⁻¹.

Figura 6: Productividad de biomasa del mutante *std1* durante la privación de N en condiciones fotoautotróficas.

La disposición experimental fue la misma que en la Figura 5 pero utilizando sólo un medio MM-N.

(A) Se recolectaron las células de 1 mL de cultivo, se centrifugaron y se representaron pélets.

(B) Se determinó el volumen celular total por mL. Se muestran las medias ± SD (n = 7).

(C) Se determinó la biomasa como peso seco de cinco cultivos de 5 mL recolectados por filtración, aclarados y secados durante la noche. El análisis del almidón intracelular permitió determinar la fracción de almidón de la biomasa total (área sombreada). Se muestran las medias ± SD (n = 3).

Figura 7: Las células mutantes *std1* forman agregados (palmeloides) encerrados por la pared de la célula madre.

(A) Imágenes de contraste de campo brillante e interferencia diferencial de cepas de tipo silvestre, mutantes *std1* y complementadas (*std1* :: STD1 1 y 2) cultivadas en medio mínimo y 2% de CO₂ y luego sometidas a privación de N durante 0, 2 ó 6 días. Las flechas indican las paredes de las células madre. Barras de escala = 10 μm.

(B) Distribución del diámetro celular o de agregado, respectivamente, y comparación del volumen celular por mL de WT, mutante *std1* y cepas rescatadas *std1* :: STD1 1 y 2 en 0, 2 ó 6 días de condición MM-N/CO₂. El mismo experimento representativo que en (A).

5 (C) Control de carga de azul de Commassie del experimento de inmunodetección que se muestra en la Figura 4D.

Figura 8: Evolución del contenido de clorofila, volumen celular total y número de células durante la privación de nitrógeno. Las células se cultivaron en TAP o medio mínimo en aire con 2% de CO₂ bajo una iluminación constante de 100 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El día 0, las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en TAP-N (paneles de la izquierda) o MM-N (paneles de la derecha). Las mediciones se realizaron en el tipo silvestre (WT), mutante *std1* y en dos cepas complementadas *std1* :: STD1 1 y *std1* :: STD1 2.

10

(A) Concentración de clorofila. Se muestran medias \pm SD de 5 experimentos para TAP-N y 7 experimentos para MM-N (3 durante 10 d).

(B) Volumen celular total en $\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$, y (C) la concentración de células o partículas por mL fue registrada por Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman). Se muestran medias \pm SD (n = 6 para experimentos TAP-N y n = 7 para experimentos MM-N).

15

Figura 9: Comportamientos de crecimiento de las células de *Chlamydomonas std1* y de tipo silvestre cultivadas fotoautótrofamente en fotobiorreactores de 1 L funcionando como turbidostatos durante la transición del crecimiento exponencial a las condiciones de privación de N. La densidad celular se midió usando una sonda de absorción y se mantuvo a un nivel constante mediante la inyección de medio fresco. Debido al fenotipo de agregación de *std1*, la OD_{880 nm} se reguló a diferentes valores para WT (OD_{880 nm} = 0,4) y *std1* (OD_{880 nm} = 0,3) para alcanzar concentraciones similares de biomasa (0,15 g de peso seco L⁻¹) en los dos cultivos. Después de 48 h de estabilización en presencia de MM bajo iluminación constante (500 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en presencia de aire enriquecido en CO₂ al 2%, el medio de dilución fue sustituido por MM-N (t0). Las mediciones de la concentración de amonio en el medio de cultivo mostraron un agotamiento completo después de 45 h. (A) Cantidades acumuladas de medio fresco añadidas para mantener el cultivo a una concentración constante de biomasa. Se muestran datos de tres replicados biológicos para los cultivos de WT y de *std1*; (B) Las medidas de la productividad de biomasa (g peso seco d⁻¹ L⁻¹) se determinaron a partir de t0, t48 y t72 a partir de las tasas de dilatación y las medidas de biomasa. Se muestran las medias \pm SD (n = 3).

20

25

Figura 10: Formación de MGDG oxidado en el mutante *std1*.

30 (A) Sobreacumulación de especies MGDG oxidadas en el mutante *std1* detectado en la placa de TLC.

(B) Aclaración estructural de una especie MGDG 34 oxidada (16: 2 O₂; 18: 1) que se acumula en *std1*.

Nota: C2 y C7 representan dos líneas complementadas independientes, del mutante *std1*.

Figura 11: Un análisis completo de lípidoma en WT, mutante *std1* y las dos líneas complementadas en respuesta a la falta de nitrógeno.

35 Figura 12: Sobreacumulación de MGDG oxidado en el mutante y su distribución de especies.

(A) Acumulación total de MGDG oxidado en respuesta a días de carencia de nitrógeno en WT, mutante *std1* y dos líneas complementadas.

(B) Distribución de especies moleculares de MGDG oxidado.

Figura 13: Sobreacumulación de una lipoxigenasa 1 putativa (CreLOX1) en el mutante *std1* de *Chlamydomonas*.

40 Una imagen del gel de SDS-PAGE teñido por azul de Coomassie que demuestra la apariencia de una banda más intensa con una masa de \sim 110 kDa. El tipo silvestre, el mutante *std1* y dos líneas complementadas independientes (C2, C7) se cultivaron hasta la fase exponencial en condiciones autótrofas estándar en un medio mínimo al que se suministra 2% de CO₂ a 100 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de la lisis celular, las proteínas solubles e insolubles se fraccionaron por ultracentrifugación con un colchón de sacarosa. Las proteínas de la fracción del pélet que contiene las membranas se resolubilizaron por adición de Triton X-100, se ultracentrifugaron y se separaron en un gel Bis-Tris NuPAGE® al 10%. Después de ser teñidos con Azul Brillante de Coomassie, se detectó una banda intensa en el mutante *std1* a \sim 110 kDa y las regiones de gel correspondientes de todas las muestras se escindieron y se sometieron a análisis de espectrometría de masas.

45

Figura 14: Inhibición de TAG y acumulación de almidón en el mutante por inhibidores LOX.

50 (A). Acumulación de almidón.

(B). Acumulación de TAG.

Ejemplos.

5 Ejemplo 1: La doble especificidad de la quinasa regulada por fosforilación de tirosina DYRKP-1 controla negativamente la acumulación de almidón y aceite durante la privación de nutrientes en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Métodos.

Cepas y condiciones de cultivo.

10 Como se describe en Chochois et al., 2010, se eligió la cepa CC125 (*mt-nit1 nit2*) como fundamento genético para la generación de mutantes y se usó como cepa de tipo silvestre en este estudio. La cepa mutante *std1* se generó mediante transformación con el plásmido pSL-X linealizado con *KpnI* que alberga el casete de resistencia a la paromomicina *AphVIII*. En el caso de *std1*, sólo se insertó en el genoma un fragmento de ~1900 pb de la pSL-X de ~4800 bp. Las células se cultivaron mixotróficamente en medio Tris-acetato-fosfato (TAP) (Harris, 2009) en un agitador incubador a 25°C, bajo luz continua a ~100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para los experimentos de privación, se desarrollaron mixotróficamente precultivos en medio TAP o fotoautótrofamente en un medio mínimo tamponado con MOPS (Harris, 2009) y 2% de CO₂ en el aire a una densidad de 2 - 5 x 10⁶ células mL⁻¹. Después de tomar las muestras a t = 0, el cultivo se centrifugó a 25 °C y 1789 g durante 4 minutos, el sedimento celular se lavó una vez y se resuspendió en medio privado de N o S. Debe observarse que una densidad de células inicial idealmente idéntica de los cultivos es crítica para obtener datos comparables para todas las cepas estudiadas. Debido a la formación de palmeloides de *std1*, se comparó el volumen celular total por mL o el contenido de clorofila para ajustar los cultivos antes de la carencia.

20 Caracterización genética y complementación de la cepa mutante *std1*.

25 Para comprobar la frecuencia de integración del ADN insertado, se realizó el análisis de transferencia Southern con células de tipo silvestre y mutantes *std1*. El ADN genómico se preparó como se describió anteriormente (Tolletier et al., 2011), y se separaron 4, 6 o 8 μg de ADN genómico restringido con *NotI* en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda marcada con digoxigenina complementaria a parte del gen *AphVIII* del casete de resistencia insertado. Se utilizó un kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche) para el marcado de la sonda usando los cebadores 5'-CGAAGCATGGACGATGCGTT-3' (SEQ ID N°: 4) y 5'-CGAGACTGCGATCGAACGGACA-3' (SEQ ID N°: 5). La hibridación con el fragmento de PCR resultante de 400 pb se realizó durante la noche a 50 °C usando tampón DIG Easy Hyb (Roche). Se aplicaron anti-Digoxigenin-AP y CSPD como sustrato (Roche) para detectar señales usando G:BOXChemin XL (Syngene). Para determinar el sitio de integración del casete de resistencia a la paromomicina, el *walking* del genoma se realizó de acuerdo con el Kit GenomeWalker de Clontech. El ADN genómico de la cepa *std1* se digirió con *FspI* y se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias 5'-CTGGTGTGCGCGAGCTGGCCCACGAGGAG-3' (SEQ ID N°: 6) (GPS1) y 5'-TGGTTCGGGCGGAGTGTTCCGCGGCGTT-3' (SEQ ID N°: 7) (GPS2) sirvieron como cebadores específicos de gen que permiten la determinación de la secuencia genómica aguas abajo del casete insertado *AphVIII*. La Advantage GC Genomic LA polimerasa (Clontech) se utilizó para las reacciones de amplificación. Para la complementación de la cepa *std1*, se llevó a cabo una reacción de PCR en ADN genómico de tipo silvestre usando los cebadores 5'-GTCTAGAATGTCGCTCCGCTGAACCGATG-3' (SEQ ID N°: 8) (*XbaI* forHyg) y 5'-GTCTAGACTACATGCTGTGCGAGCGAGG-3' (SEQ ID N°: 9) (*XbaI* RevHyg) y la DyNAzyme™ EXT DNA Polimerasa (Finnzymes Oy). Los genes amplificados de 6913 pb que codifican *DYRKP-1* se restringieron mediante *XbaI* y se clonaron en el vector pSL-Hyg digerido con *XbaI*, que procedía de pSL18 (Dauvillee et al., 2003) bajo el control del promotor *PSAD* y que portaban un casete de resistencia a la higromicina (Berthold et al., 2002). Las células *std1* se transformaron con pSL-Hyg-STD1 linealizado con *KpnI* por agitación con perlas de vidrio (Kindle, 1990), se seleccionaron en higromicina 20 mM y luego se cribaron aplicando el mismo protocolo que para aislar la cepa mutante (Chochois et al., 2010). Los transformantes se expusieron durante varios días a la privación S o N, se transfirieron a medio mínimo y se sometieron a la oscuridad, y a continuación a tinción con yodo para analizar los niveles de almidón restantes.

45 Análisis filogenético.

50 Se alinearon las secuencias de aminoácidos usando el software MAFFT versión 6 (Kato et al., 2002). A continuación, la alineación resultante se refinó manualmente utilizando SeaView versión 4 (Gouy et al., 2010) y las regiones donde la homología era dudosa se retiraron de un análisis posterior. Se mantuvieron un total de 313 posiciones de aminoácidos para el análisis filogenético de las proteínas DYRK. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando los planteamientos neighbor-joining (NJ) (vecino más cercano), Maximum Likelihood (ML) (máxima verosimilitud) y Parsimony (Pars) (parsimonia) en el paquete Phylip de inferencia de Phylogenetic versión 3.69 (Felsenstein et al., 2005). El programa PROTML se usó para el análisis de ML y el orden de entrada de secuencia fue aleatorizado (20 revoltijos (*jumbles*)). Se utilizaron los programas SEQBOOT y CONSENSE para el cálculo del valor de *bootstrap* en 100 repeticiones y reconstrucciones de árboles de consenso, respectivamente. Para examinar la confianza de los nodos, se llevaron a cabo análisis de NJ y Pars usando los programas

NEIGHBOR y PROTPARS. Las matrices de distancia utilizadas para el análisis NJ se crearon con el programa PROTDIST. Los árboles filogenéticos se dibujaron con MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Análisis de ARN y RT-PCR.

- 5 El ARN total se aisló como se describe en Liu et al., 2005. Para las reacciones de RT-PCR se empleó 1 µg de ARN total tratado con DNase para la aplicación del *kit* OneStep RT-PCR (Qiagen). Para obtener información de la secuencia del gen *DYRKP-1/STD1* transcrito completo, se realizaron tres RT-PCRs solapantes usando pares de cebadores en 5'-CATAGTGCTCAGCAGGGGACAAGGC-3' (SEQ ID N°: 10) (Std1UTR1) y 5' -
- 10 AGCGTGCCAGAGGTTTCGCCGTC-3' (SEQ ID N°: 11) (Std1P3rev), 5'-CCGCGGACGGCGAAACCTCTGGCAC-3' (SEQ ID N°: 12) (Std1FW2) y 5'-GATCTCGTCCAGCGACTGGTCAAAGTAG-3' (SEQ ID N°: 13) (G4rev14) y 5' -
- 15 GCGGATCCGACGAGCAGGGCAACGTGCTG-3' (SEQ ID N°: 14) (ACG4_FW3) y 5'-CGGCAAGCTTCTACATGCTGTGAGCGAGG-3' (SEQ ID N°: 15) (ACG4_Rev1), el último par de cebadores se creó inicialmente para expresar la región correspondiente como antígeno. Para comparar los niveles de transcripción en las cepas mutantes y complementadas de tipo silvestre, se usaron los pares de cebadores Std1FW2 y G4rev14 para amplificar parte del transcrito *DYRKP-1*. Se diseñaron cebadores específicos para una actina (nombre del Locus Cre13. G603700, ID de Proteína 515031), que sirve como gen de control expresado constitutivamente (5'-AATCGTGCGGACATCAAGGAGAA-3' (SEQ ID N°: 16) y 5'-TTGGCGATCCACATTTGCTGGAAGGT-3' (SEQ ID N°: 17)).

Análisis de transferencia Northern.

- 20 Para la extracción de ARN, se recogieron en hielo 15 mL de cultivos celulares a valores del tiempo relativos, se centrifugaron durante 1 min a 1789 g y la suspensión de células de 500 µL se transfirió a un tubo de 1,5 mL en hielo y se mezcló con 500 µL de tampón de lisis de ARN. La extracción de ARN, la separación en los geles de agarosa formaldehído y la transferencia Northern se realizaron como se describe en (Liu et al., 2005). Las membranas se hibridaron con sondas de ADN que contenían un fragmento del gen *STD1* o el gen *CBLP2* como control de carga.
- 25 Se obtuvo un plásmido 1. pAC-STD1 mediante una ligación del vector pQE-30 restringido con *Bam*HI-*Hind*III (Qiagen) y un producto de RT-PCR restringido por *Bam*HI-*Hind*II que codifica la parte 3' de *DYRKP-1*. La RT-PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores 5'-GCGGATCCGACGAGCAGGGCAACGTGCTG-3' (SEQ ID N°: 14) (ACG4_FW3) y 5'-CGGCAAGCTTCTACATGCTGTGAGCGAGG-3' (SEQ ID N°: 15) (ACG4_Rev1), dando lugar a un producto de 1116 pb. Un fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 1 kb de este plásmido pAC-STD1 y el ADNc de 1 kb de *CBLP2* se usaron para la hibridación. Se detectaron señales radioactivas usando placas de fosforimager BAS-IP MS2040 (Raytest; <http://www.raytest.de>), escaneadas con un fosforimager Molecular Imager FX (Bio-Rad; <http://www.biorad.com/>), y se tomaron en imágenes usando el programa Quantity One-4. 5. 1 (Bio-Rad).
- 30

Análisis de ADN genómico.

- 35 Para determinar la concentración de ADN genómico durante los experimentos de relación con el tiempo de privación de nitrógeno, las células equivalentes a 1, 2 mm³ de volumen celular total por término medio se recolectaron mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C. El ADN genómico de dos muestras por replicado para cada valor del tiempo se preparó mediante extracción con fenol-cloroformo como se describió anteriormente (Tolleter et al., 2011). Las concentraciones de ADN se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

- 40 Preparación de proteínas, cuantificación y análisis de inmunotransferencia.

- Para la detección de *DYRKP-1*, se prepararon lisados de células solubles de la forma que sigue: se recogieron 100 mL de cultivos celulares de *C. reinhardtii* en la fase exponencial (eq. a 5×10^6 células/mL o 0,8 mm³/mL) mediante centrifugación durante 2 min a 1789 g y se resuspendieron en 1 mL de tampón para lisis (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 154 mM, 0,1x cóctel inhibidor de proteasa; Sigma P9599). Las células se sometieron a ondas sonoras en hielo durante 90 segundos con un ajuste de 1 s de pulso/1 s de pausa. Los lisados se cargaron sobre un colchón de sacarosa (HEPES-KOH 20 mM pH 7,2, sacarosa 0,6 M) y se centrifugaron en un rotor MLA-55 (Beckman Coulter) durante 30 min a 151 300 g y 4°C. Las proteínas solubles se mezclaron con un volumen de 2x tampón de muestra (Schulz-Raffelt et al., 2007) o 2x tampón de muestra LDS (Invitrogen) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C o 10 minutos a 70°C antes de cargar en un gel de 8% SDS-poliacrilamina. La transferencia Western se llevó a cabo durante 1:45 h para detectar la expresión de *DYRKP-1* por ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific), utilizando un anticuerpo de péptido purificado (www.proteogenix-antibody.com). Las muestras de proteínas tomadas durante la cinética de carencia de nitrógeno se trataron de la forma siguiente: se guardaron a -80°C hasta su uso pélets de células equivalentes a 1, 2 mm³ de volumen celular total. Las proteínas totales de dos muestras replicadas en valor del tiempo se extrajeron en 70 µL de tampón que contenía Tris 50 mM pH 8, EDTA 10 mM y 2% de SDS durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido por una centrifugación en frío de 2 minutos. Para cuantificar las concentraciones de proteínas, se analizaron 2 µL de extractos de proteína por medida colorimétrica con ácido bicinchónico (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific). Para el análisis de inmunotransferencia, se separaron 10 - 12 µg de extractos proteicos totales en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa BioTrace™ NT (Pall Life
- 45
- 50
- 55

Sciences, <http://www.pall.com>) y se analizaron mediante inmunodecoración con anticuerpos contra AtpB, RbcL, CytF, PsbD (D2) (Agrisera) y HSP70B (Schroda et al., 1999). El anticuerpo DYRKP se obtuvo por inmunización de dos conejos con dos péptidos sintetizados (DGMDDPGYSRKEVPNP-cys y PAVNHEDVELFRN-cys) conjugados con KLH (hemocianina de lapa de bocallave) como proteína portadora (www.proteogenix-antibody.com).

Medidas de almidón y clorofila.

Los contenidos de almidón y clorofila se midieron de acuerdo con Chochois et al., 2010. Se recogió 1 mL de cultivo, se centrifugó a ~20.000 g durante 10 minutos, se resuspendió en 1 mL de alcohol metílico para la extracción de clorofila y se almacenó a -80°C. Los pélets se secaron y se añadieron 400 µL de agua. Para solubilizar el almidón, las muestras se autoclavarón ajustando en "ciclo seco". A continuación el almidón se degradó a glucosa mediante la adición de 200 µL de solución de amiloglicosidasa (1 U/mL, Roche) y la incubación a 55°C durante 1 - 2 h. Se determinó la concentración de glucosa utilizando un analizador automático de azúcar (Ysi modelo 2700 select, Yellow Springs, OH, EE.UU.). La clorofila se extrajo mediante metanol, y se determinaron la clorofila a y b midiendo la absorbancia a 653, 666 y 750 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS (SAFAS UVmc2 con el software SP2000).

Cuantificación del contenido de aceite.

Se recolectaron células de *C. reinhardtii* (eq. a 2 mm³ de volumen celular total) por centrifugación a 1000 g durante 2 min (a 4°C). Las células se congelaron inmediatamente a -80°C o bien se apagaron en isopropanol caliente para extracciones inmediatas de lípidos. Los lípidos celulares totales se extrajeron utilizando una mezcla de hexano e isopropanol (Li-Beisson et al., 2010). La fase de disolvente orgánico conteniendo lípidos celulares totales se recogió y se secó bajo una corriente de gas nitrógeno, y después se resuspendió en 200 µL de cloroformo: metanol (2:1, v/v). Los triacilgliceroles (TAG) se separaron primero de otras clases de lípidos en cromatografía en capa fina, se carbonizaron con CuSO₄ al 2% disuelto en H₃PO₄ al 8% en agua, y después se calculó el contenido de TAG basándose en un método densitométrico después de compararse con una curva estándar generada con un patrón C17:0 TAG (Siaut et al., 2011).

Fluorescencia de clorofila.

La fluorescencia de clorofila se midió usando un Dual Pam-100 (Heinz Walz). Las muestras se pusieron en una cubeta bajo agitación constante a temperatura ambiente y se adaptaron a la oscuridad durante 5-10 minutos antes de la medición. Las curvas de luz se registraron con diez etapas de iluminación que oscilaban entre 15 y 715 µmol m⁻² s⁻¹ PAR, cada intensidad luminosa se mantuvo durante 30 s después de un destello de saturación para medir Fm'. La ETR se calculó como se describió anteriormente (Rumeau et al., 2005).

Determinación de la biomasa.

Para determinar la acumulación de biomasa de un cultivo, a cada valor del tiempo se vertieron tres muestras de 5 mL sobre un filtro de fibra de vidrio en placas de aluminio desechables (VWR, Ref. 611-0739 y -0741) y se secaron durante la noche en un horno a 80°C. Se trataron igualmente tres muestras de 10 mL del medio. Los filtros de papel se pesaron antes y después de añadir células y se restó el valor de la media para el medio.

Microscopía.

Para microscopía óptica se usó un microscopio Leica DMRXA (Leica Microsystems, Alemania). Las células se fijaron con glutaraldehído al 0,25% en el medio, en caso necesario. Para comparar fácilmente las concentraciones celulares, se utilizó una cámara de Neubauer. Las imágenes fueron capturadas con el software Spot Insight 4 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, EE.UU., www.spotimaging.com).

Resultados.

Identificación y caracterización genética del mutante *std1* de degradación del almidón.

A partir del cribado de una biblioteca de inserción de ADN creada por transformación de la cepa de tipo silvestre CC125 de *C. reinhardtii* con un casete de resistencia a la paromomicina (*AphVIII*), se aislaron previamente varios mutantes afectados en la degradación del almidón (Chochois et al., 2010). Uno de estos mutantes, denominado *std1* de "degradación del almidón 1" (**starch degradation 1**), mostró una velocidad más lenta de degradación del almidón en la oscuridad en comparación con su progenitor de tipo silvestre (Figura 1A). El análisis de transferencia Southern indicó una única integración del casete de paromomicina en el genoma mutante (Figura 2A). La secuenciación de las regiones flanqueantes de ADN mostró la inserción del casete *AphVIII* dentro del tercer exón de un gen, anotado como Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylated Protein Kinase (proteína quinasa fosforilada por tirosina de doble especificidad *DYRK2* (genoma *Chlamydomonas* versión 4.0), y renombrado aquí *DYRKP-1* (Figura 1B). El modelo del gen *DYRKP-1* de *Chlamydomonas* se confirmó secuenciando tres fragmentos de ADNc solapantes producidos por RT-PCR (Figura 1B). El *DYRKP-1* de *Chlamydomonas* consta de 14 exones y 13 intrones, conteniendo la región codificante 3834 nucleótidos. Con respecto al modelo génico Cre07. g337300 (Phytozomev 9. 0), el codón de inicio

se encuentra 51 nucleótidos aguas arriba. El mutante *std1* fue complementado utilizando una construcción que contenía la secuencia genómica *DYRKP-1* de tipo silvestre impulsada por el promotor *psaD* (Figura 2B). Se aislaron dos cepas complementadas independientes *std1* :: STD1 1 y *std1* :: STD1 2, mostrando los niveles de expresión del gen *STD1* y las cantidades de proteína Std1 ligeramente inferiores al progenitor de tipo silvestre (Figura 1C, D). Se observaron patrones similares de acumulación de almidón y cinética de degradación en respuesta a la privación de N o S tanto en las líneas complementadas como en el progenitor de tipo silvestre (Figura 2C). El análisis de transferencia Northern reveló que el transcrito *DYRKP-1* se induce fuertemente después de 1 día de agotamiento de N, manteniéndose los niveles de transcripción en un nivel alto después de 3 días de privación (Figura 1E). Obsérvese que aunque la expresión del gen *DYRKP-1* fue impulsada por el promotor *PSAD* constitutivo en la línea complementada, la acumulación del transcrito *DYRKP-1* aumentó de la misma manera que en células de tipo silvestre en respuesta a la privación de N, lo que sugiere que la regulación de la expresión del gen *DYRKP-1* se regula a un nivel post-transcripcional.

Chlamydomonas DYRKP-1/STD1 es un miembro de un nuevo grupo específico de plantas de la familia de proteínas DYRK.

Un análisis filogenético de la familia de genes DYRK permitió distinguir cuatro ramas distintas: las subfamilias DYRK1, DYRK2 y Yak descritas anteriormente, y un nuevo grupo de DYRK, denominado aquí DYRKP (por Plant DYRK) que comprende solamente miembros del linaje verde (plantas, musgos y algas), incluyendo *Chlamydomonas* DYRKP-1/STD1 (Figura 3A). Mientras que los genomas de las algas albergan sólo un miembro del grupo DYRKP, los musgos y las plantas superiores contienen de dos a seis homólogos similares a plantas. Es interesante que los genomas de plantas y algas contienen homólogos de Yak, pero no homólogo de DYRK1 (Han et al., 2012), siendo identificados los homólogos de DYRK2 solamente en algas y musgos, pero no en plantas superiores. Las quinasas DYRK muestran características de secuencia conservadas, en particular la caja-(DH) de homología de DYRK que precede al dominio catalítico conservado (Figura 3B). La secuencia de consenso para los subgrupos DYRK1 y DYRK2 es NxGYDD (D/E) (N/R)xDY, ligeramente diferente para el grupo Yak (Figura 3B). La caja-DH del nuevo grupo DYRKP identificado muestra un motivo alterado: (N/H) (R/K) TGFEExK (D/E/N) (F/L).

El *std1* muestra un fuerte aumento en la acumulación de reservas y una actividad fotosintética más robusta bajo la privación de nutrientes en condiciones de fotoautotrofia.

El efecto del agotamiento del nitrógeno se estudió luego en diferentes condiciones de crecimiento (mixotróficas vs. fotoautótrofas) que se sabe que afectan de forma diferente al estado energético intracelular y la acumulación de compuestos de reserva como el almidón (Ral et al., 2006) o TAG (Goodson et al. 2011). En condiciones mixotróficas (en presencia tanto de acetato como de luz), no se observó diferencia en la acumulación de almidón entre el WT y el mutante *std1* en respuesta a la privación de N (Figura 4A), pero se observó un aumento en el contenido de aceite en el mutante después de 1 a 3 días de inanición (Figura 4B). En condiciones totalmente fotoautótrofas, se observó una acumulación de almidón mucho más alta y persistente en *std1* en comparación con el WT y con ambas líneas complementadas (Figura 4B), aumentando el contenido de aceite en el mutante después de 3 días de carencia (Figura 4B). Cuando la privación de N se realizó en condiciones fotoautótrofas a una velocidad de fluencia menor (35 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), WT y las líneas mutantes complementadas acumularon solo niveles de almidón bajos, mientras que el mutante *std1* acumuló altas cantidades de almidón (Figura 5A-D). También se observó una mayor acumulación de almidón en *std1* en respuesta a la privación de azufre (Figura 5E-H). Se obtuvieron los mismos resultados en respuesta a la privación de azufre (datos no mostrados). La tasa de transporte de electrones fotosintéticos (ETR), determinada a partir de mediciones de fluorescencia de clorofila, mostró una disminución paralela en las cepas *std1* y testigo cuando se realizó la privación de N en condiciones mixotróficas (Figura 4C, panel izquierdo). En cambio, cuando la privación de N se llevó a cabo en condiciones fotoautótrofas, la caída en ETR fue menos pronunciada en *std1* en comparación con las cepas testigo (Figura 4C, panel derecho). Tomados en conjunto, estos datos muestran que, dependiendo del estado de energía intracelular, *std1* acumula más compuestos de reserva y mantiene una actividad fotosintética más alta que las cepas de control en respuesta a la privación de nutrientes. La inmunodetección de los principales componentes fotosintéticos mostró una disminución similar de PSII, PSI, citocromo b6f; subunidades ATPasa y Rubisco en *std1* en comparación con el progenitor de tipo salvaje (Figura 4D). Curiosamente, la oxidasa alternativa mitocondrial (AOX) fue mucho más abundante en el mutante que en el WT (Figura 4D), lo que indica un desequilibrio redox en el mutante.

Aumento de la producción de biomasa en mutante *std1* durante la privación autotrófica de nitrógeno.

Se observó un fuerte aumento en la producción de biomasa en *std1* a partir del tamaño de los pélets celulares recolectados después de 3 y 10 días de cultivo en un medio privado de N (Figura 6A). Notablemente, mientras que las líneas de tipo silvestre y complementadas se contaban como partículas de una sola célula de aproximadamente 6 - 7 μm de diámetro, el mutante *std1* consistía en agregados de 2, 4 y 8 células encerradas por la pared de la célula madre y medidas como partículas de 10 - 20 μm de diámetro (Figura 7). Esta característica fenotípica, previamente descrita en varios mutantes de *C. reinhardtii*, se llama palmeloide (Harris, 2009). A pesar de la agregación de las células, el volumen celular total fue similar en cultivos de tipo silvestre y mutantes en condiciones de N-repleto (Figura 6B). En respuesta a la privación de nitrógeno, el volumen celular total mostró solo ligeras variaciones en los cultivos de tipo silvestre y en los complementados, pero aumentó mucho en *std1* (Figura 6B). Cuando la privación de

5 nitrógeno se realizó en condiciones mixotróficas (TAP-N), el mutante *std1* mostró un comportamiento similar al de las células de tipo silvestre (Figura 8). La biomasa, medida como peso seco, mostró un aumento de 1,7 veces en cepas de tipo silvestre y complementadas después de 6 días de agotamiento de N, y un aumento de más de 3 veces en *std1* (Figura 6C). Con el fin de confirmar el espectacular aumento de la producción de biomasa y almidón observado en *std1*, se llevaron a cabo experimentos adicionales en condiciones más controladas usando fotobiorreactores de 1L que funcionan como turbidostatos (Figura 9). En estos experimentos, la biomasa celular se mantuvo a un nivel constante (monitorizado por OD_{880nm}) mediante la adición de medio de cultivo fresco, permitiendo así la medición de la tasa de dilución y la productividad de biomasa. En t_0 , se reemplazó la dilución por un medio mínimo N-repleto por medio mínimo libre de N, dando como resultado una disminución del contenido de amoníaco del medio de cultivo, que se agotó completamente después de 45 h (Figura 9A). En ese momento, la productividad de biomasa del WT comenzó a disminuir gradualmente y se detuvo completamente después de 72 h. En marcado contraste, la productividad de biomasa de *std1* aumentó (de 45 h a 65 h) y luego comenzó a disminuir gradualmente, siendo aún la productividad de biomasa a 72 h más alta que la productividad inicial del WT. Estos experimentos demuestran que *std1* produce más almidón y biomasa que la cepa testigo cuando se somete a privación de N en condiciones fotoautótrofas.

Discusión.

20 Los autores de la presente invención informan en el presente texto sobre la caracterización del mutante *std1* afectado en un homólogo de la quinasa DYRK perteneciente a un nuevo subgrupo (denominado *DYRKP*), específico del linaje verde. El mutante *std1*, el primer mutante DYRK del linaje verde publicado hasta ahora, acumula altas cantidades de almidón intracelular y de aceite y muestra una persistente actividad fotosintética en respuesta a la carencia de nutrientes.

Control de la biomasa y acumulación de reservas por DYRK quinastas.

25 Como se muestra en los experimentos realizados en diferentes condiciones tróficas (mixotróficas frente a fotoautótrofas), el estatus de energía celular, además del estatus de los nutrientes, desempeña un papel central en el control de la acumulación de almidón y aceite en el mutante. En condiciones mixotróficas (células iluminadas que crecen en un medio que contiene acetato), condiciones en las que el estatus energético es alto, se acumulan altos niveles de almidón en el WT en respuesta a la privación de N, pero no se observa aumento del almidón en *std1*. Cabe tener en cuenta que en estas condiciones se observó en el mutante un aumento en el contenido de aceite. Sin embargo, en condiciones fotoautótrofas, la acumulación de almidón en el WT depende de la intensidad de la iluminación (baja a baja intensidad de luz y más alta a luz más alta). Sorprendentemente, la dependencia de la acumulación de almidón sobre el estatus de la energía se pierde en *std1*, acumulando las células mutantes cantidades de almidón similares, si bien a velocidades diferentes, en las diferentes condiciones tróficas (Figura 4A y Figuras 5A, E). En la levadura, se ha publicado que el homólogo de DYRK Yak1 controla el almacenamiento de glucógeno, induciendo el borrado del gen YAK1 un aumento en el contenido de glucógeno intracelular (Wilson et al., 2010). Yak1 controlaría la detención del ciclo celular en respuesta a la privación de glucosa fosforilando los factores de transcripción Msn2 y Hsf1 (Moriya et al., 2001). Más recientemente, se propuso que Yak1 se encuentra en el centro de una cascada reguladora que controla el crecimiento y la respuesta al estrés dirigiéndose a diferentes factores de transcripción (Malcher et al., 2011). En cuanto al mutante Yak1 de la levadura, el aumento de la reserva y de la producción de biomasa de *std1* en respuesta a la privación de nutrientes indica que una señal requerida para detener el crecimiento y la acumulación de reservas no se percibe correctamente o no se transfiere. En la levadura, Yak1 está entre otros factores de transcripción como Sfp1 y Msn2/4, en la intersección entre las rutas PKA y TOR (Röhde et al., 2008). El punto hasta el cual *DYRKP* de *Chlamydomonas* y plantas superiores están involucradas en las cascadas de señalización TOR y cAMP-PKA, necesitará más investigación para ser aclarado.

45 Pérdida de la regulación por retroalimentación de la fotosíntesis en *std1*.

En las microalgas, la disminución de la actividad fotosintética es parte de la respuesta celular general a la privación de nutrientes, que contribuye a mantener un equilibrio entre la generación de potencia reductora por la fotosíntesis y la capacidad de usarla con fines metabólicos (Grossman, 2000). Se ha publicado que el mutante *sac1* (defecto en la respuesta a la *Sacclimation*) murió a los dos días de privación de S a la luz, debido a una incapacidad para regular a la baja la fotosíntesis, dando como resultado una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan los centros PSII (Davies et al., 1996, Wykoff et al., 1998). En cambio, el mutante *std1* muestra una disminución en los complejos fotoinsintéticos similares a la observada en las cepas de control (Figura 4D), pero su actividad fotosintética, aun cuando disminuye, permanece más alta que en la cepa testigo en condiciones fotoautótrofas (Figuras 4C y Figura 5B, F). En paralelo, el mutante *std1* acumula más compuestos de reserva que las cepas de control. Por tanto, los autores de la presente invención proponen que la pronunciada acumulación de almidón que se produce en *std1* funciona como un sumidero para reducir la potencia generada por la fotosíntesis, disminuyendo así la inhibición de la fotosíntesis por retroalimentación. Los estudios de perfilación de metabolitos han demostrado la existencia en plantas superiores de una correlación negativa entre la producción de biomasa de almidón (Sulpice et al., 2009). Tal correlación negativa se suprime en el mutante *std1* en condiciones de limitación de nutrientes donde se observan producciones paralelas de almidón y biomasa, al menos en condiciones de escasez de nutrientes.

Implicaciones biotecnológicas.

El descubrimiento de un regulador negativo que controla el crecimiento y la acumulación de reservas en condiciones de privación de nutrientes tiene implicaciones biotecnológicas importantes para las microalgas. De hecho, estos microorganismos unicelulares se consideran cada vez más como una fuente de biomasa prometedoras para la producción de biocombustibles de próxima generación. Una de las principales ventajas de las microalgas, cuando se compara con plantas superiores, es su capacidad para acumular cantidades elevadas de almidón o lípidos, siendo estos compuestos convertibles en bioetanol o biodiesel, respectivamente. Sin embargo, los análisis tecnoeconómicos han indicado que se necesita aumentar la productividad de los compuestos de reserva para alcanzar la viabilidad económica.

Ejemplo 2: Información adicional sobre la caracterización del mutante *std1*.

El Ejemplo 1 describe una acumulación masiva de aceite y almidón después de una carencia de nitrógeno prolongada en el mutante *std1*. Para analizar el mecanismo o mecanismos moleculares entre el gen mutado DYRK y el fenotipo observado en la formación de reserva de carbono, se llevaron a cabo análisis comparativos transcriptómicos, cuantitativos tanto proteómicos como lipidómicos del mutante *std1* y se compararon con su cepa 137AH de tipo silvestre.

Resultados.

El mutante *std1* sobreacumuló MGDG oxidado.

En el ejemplo 1, los autores de la presente invención observaron la sobreacumulación de triacilglicerol (TAGs, aceites) en el mutante *std1* después de una prolongada carencia de nitrógeno (Figura 4B). Para obtener una imagen completa de los cambios lipidómicos globales en el mutante, se cuantificaron las clases de lípidos basándose en cromatografía en capa fina (TLC), y se compararon los cambios en las especies moleculares de lípidos utilizando el estado de la técnica LC-MS/MS. En primer lugar, cada clase de lípidos se cuantificó basándose en TLC. Como se muestra en la Figura 10A, además de los lípidos polares clásicos (es decir, MGDG, DGDG, DGTS, PG, PE) presentes en todas las cepas, se detectó una nueva banda justo debajo del MGDG solamente en el mutante *std1* en la placa de TLC (señalada mediante una flecha). Los lípidos presentes en la banda se recuperaron por medio de elución con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) y se sometieron a identificación por LC-MS/MS. Los análisis de espectrometría de masas revelaron la presencia de una mezcla de MGDG 34 oxidado, con una combinación de ácidos grasos C16 y C18 con diferente nivel de insaturaciones. La identificación por espectrometría de masas para una de las especies moleculares oxidadas MGDG34:x se muestra en la Figura 10B.

La cantidad relativa de estos MGDG oxidado en las células del mutante se examinó con más detenimiento en comparación con el WT, también de una manera dependiente del tiempo en respuesta a la carencia de nitrógeno. Se recolectaron células cultivadas en fase intermedia-log una vez al día durante 5 días y se extrajeron los lípidos celulares totales mediante el método de hexano e isopropanol caliente. El extracto lipídico total se sometió después a análisis lipidómico mediante el estado de la técnica qTOF UPLC-MS/MS. Las muestras se sometieron a análisis tanto positivos como negativos, para para la detección de lípidos de la membrana polar y lípidos neutros, respectivamente. Como se muestra en la Figura 11, excepto DGTS, no se observaron diferencias significativas para todos los demás lípidos celulares entre el WT, el mutante *std1* y dos cepas complementadas (llamadas en el presente texto C2 y C7 respectivamente). Se observó una acumulación de TAG significativa después de una prolongada carencia de nitrógeno, lo que confirma los análisis anteriores basados en TLC. Por razones aún no aclaradas, el nivel de DGTS permanece constante en el mutante *std1*, pero aumentó de forma espectacular en el WT en respuesta a la carencia de nitrógeno.

Un nivel basal de MGDG oxidado está presente en células de *Chlamydomonas reinhardtii*, que permanecieron inalteradas en respuesta a la carencia de nitrógeno en el WT (Figura 12A). Bajo condiciones de nutrientes suficientes, el mutante *std1* ya acumulaba más del doble de MGDG oxidado que las células de tipo silvestre, lo que aumentó significativamente incluso más (hasta 18 veces más) de una manera dependiente del tiempo en respuesta a la carencia de nitrógeno. Las principales especies MGDG oxidadas incluyen las especies C16 y C18 y la estructura detallada de estas oxilinas es objeto de investigación en el laboratorio en este momento (Figura 12B).

Colectivamente, la mayor acumulación /síntesis de MGDG hidroperóxido apunta a la potencial desregulación del gen o genes que codifican las proteínas que catalizan o regulan las reacciones de oxidación de los lípidos. La oxidación de los lípidos es una reacción metabólica común en todos los sistemas biológicos. Esta reacción está principalmente catalizada por proteínas llamadas lipoxigenasas (LOX: EC: 1.13.11.12). Las lipoxigenasas son una familia de dioxigenasas que contienen hierro no hemo. Los LOXs catalizan la inserción de oxígeno molecular en la posición estereoespecífica de una cadena de ácidos grasos poliinsaturados. Los LOXs se encuentran ubicuamente en plantas, mamíferos, corales, musgos, hongos y también en diversas bacterias y microalgas.

CreLOX1 está regulado al alza tanto a nivel transcriptómico como a nivel proteómico en el mutante *std1*.

5 Para obtener una mejor comprensión de las redes reguladoras potenciales que implican la proteína STD1, se realizó un estudio transcriptómico comparativo basado en la tecnología de secuenciación Illumina RNA-seq (Genoscope). Análisis preliminares del conjunto de datos transcriptómicos reveló un aumento de más de 6 veces log (LogFC) del transcripto de CreLOX1 en comparación con células WT en condiciones fotoautótrofas (Tabla 2). Los análisis proteómicos cuantitativos basados en el marcaje con ¹⁵N/¹⁴N indicaron un aumento sorprendente en la proteína CreLOX1 (hasta 30 logFC) en el mutante que en el WT (Tabla 2). Este gran aumento en la cantidad de proteína CreLOX1 en las células del mutante viene apoyado además por la observación de un aumento de señal (~110 kDa) en la SDS-PAGE. Esta banda se recuperó, y se identificó que realmente contenía principalmente la proteína CreLOX1 (Figura 13 y Tabla 3).

15 Los productos derivados de estas reacciones de oxidación de ácidos grasos se denominan colectivamente oxilipinas, que son moléculas lipófilas de señalización en muchos procesos biológicos. Basándose en búsquedas de homología de proteínas con las conocidas lipoxigenasas de Arabidopsis como cebos, solo un homólogo putativo (CreLOX1) está codificado en el genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* (versión 5). El locus que codifica el CreLOX1 putativo es Cre12.g512300 (phytozome versión 5). La proteína CreLOX1 tiene un peso molecular teórico de 118 kDa y contiene dos dominios de lipoxigenasa similares a todos sus homólogos de plantas superiores. Se predice que CreLOX1 alberga un péptido de tránsito de cloroplasto largo (CPT) de 65 aminoácidos en su extremo N usando el software online ChloroP. Esto está de acuerdo con la noción de que el homólogo de Arabidopsis *closet* es el plástido localizado AtLOX5.

Planteamiento de la biología del sistema	método	condición de crecimiento	Comparación	id del gen	Anotación	LogFC	valor de p ajust.
Transcriptómica	Plataforma de secuenciación RNA-seq Illumina	MM 2% CO ₂	<i>std1</i> vs. WT	Cre12.g512300.t1.1	lipoxigenasa 1	6,7	0,000
				Cre07.g337300.t1.2	DYRKP-1	-1,93	0,000
Proteómica cuantitativa	espectrometría de masas marcaje (14)N/(15)N	24 h MM-N 2% CO ₂	<i>std1</i> vs. WT	Cre12.g512300.t1.1	lipoxigenasa 1	29,6	0,063
				Cre07.g337300.t1.2	DYRKP-1	n.d.	

20 Tabla 2: CreLOX1 está regulado al alza en el mutante *std1* de *Chlamydomonas* tanto a nivel de la transcripción como en el de proteína. Se realizaron dos estudios a gran escala, un planteamiento transcriptómico y uno proteómico, que revelan una regulación positiva de la lipoxigenasa 1 en las células del mutante *std1*. El conjunto de datos del transcriptoma fue obtenido por secuenciación de ARN utilizando la tecnología Illumina (Genoscope). Se cultivaron células de tipo silvestre y mutantes *std1* en condiciones autotróficas estándar en medio mínimo y 2% de CO₂ en el aire a 100 μE m⁻² s⁻¹ en cultivos triplicados que se combinaron antes de la recolección. Para el análisis proteómico cuantitativo, las células de tipo silvestre y las mutantes se cultivaron en condiciones autótrofas en 4 replicados para cada cepa, 2 replicados en medio mínimo que contenía ¹⁴N y 2 replicados que contenían sales de amonio ¹⁵N que conducen a un etiquetado metabólico global. Las células se centrifugaron, se lavaron, se resuspendieron en medio MM-N y se recogieron después de 24 horas de privación de nitrógeno. Antes de la extracción de proteínas, las células de tipo silvestre marcadas con ¹⁴N se combinaron con células *std1* marcadas con ¹⁵N y viceversa, dando 4 replicados biológicos. El Log2 fold change (logFC) para los resultados de proteínas es la media de 4 replicados y se da en relación con el tipo silvestre. "Adj. p-value" es el valor de p ajustado para comparaciones múltiples.

									WT	
registro	Anotación	masa (kDa)	rk	puntuación	cobertura	n° péptidos	emPAI	rec. espectrales		
Cre06.g269050.t1.1	Familia similar a NmrA, deshidrogenasa predicha	91.26	1	4671.86	67.26	54	15.31	95		
Cre12.g512300.t1.1	LIPOXIGENASA	117.92	2	4172.78	62.19	53	8.18	123		
Cre11.g477950.t1.2	función desconocida	94.80	3	4440.31	77.86	39	6.21	66		
Cre06.g288700.t1.1	Glicolato deshidrogenasa	120.45	4	3137.98	50.18	41	3.87	64		
Cre01.g054500.t1.1	NADP TRANSHIDROGENASA	112.85	5	2873.82	41.22	37	4.27	64		

									std1	
registro	Define (aug10.2; 169)	masa (kDa)	rk	puntuación	cobertura	n° péptidos	emPAI	rec. espectrales		
Cre12.g512300.t1.1	LIPOXIGENASA	117.92	1	3659.18	49.04	48	7.72	248		
Cre06.g269050.t1.1	Familia similar a NmrA, deshidrogenasa predicha	91.26	2	3740.72	56.12	43	7.61	67		
Cre11.g477950.t1.2	función desconocida	94.80	3	3733.94	62.53	34	3.44	50		
Cre01.g054500.t1.1	NADP TRANSHIDROGENASA	112.85	4	2429.72	43.65	31	2.13	37		
Cre06.g288700.t1.1	Glicolato deshidrogenasa	120.45	5	2112.46	34.45	25	1.55	37		

									C2	
registro	Define (aug10.2; 169)	masa (kDa)	rk	puntuación	cobertura	n° péptidos	emPAI	rec. espectrales		
Cre06.g269050.t1.1	Familia similar a NmrA, deshidrogenasa predicha	91.26	1	4919.95	64.92	56	17.04	108		
Cre11.g477950.t1.2	función desconocida	94.80	2	4349.85	72.75	38	7.76	77		
Cre01.g054500.t1.1	NADP TRANSHIDROGENASA	112.85	3	2898.18	42.87	36	4.88	86		
Cre06.g288700.t1.1	Glicolato deshidrogenasa	120.45	4	2823.34	45.52	38	2.59	50		
Cre12.g512300.t1.1	LIPOXIGENASA	117.92	5	2743.81	47.76	38	3.31	57		

									C7	
registro	Define (aug10.2; 169)	masa (kDa)	rk	puntuación	cobertura	n° péptidos	emPAI	rec. espectrales		
Cre06.g269050.t1.1	Familia similar a NmrA, deshidrogenasa predicha	91.26	1	4052.68	59.24	46	9.18	73		
Cre11.g477950.t1.2	función desconocida	94.80	2	3862.11	69.64	36	4.39	58		
Cre01.g005050.t1.1	RELACIONADO LIGANDO SELECTINA, proteína 1 del aparato de Golgi	99.56	3	3007.98	45.86	43	3.98	53		
Cre12.g512300.t1.1	LIPOXIGENASA	117.92	4	2399.25	40.09	33	2.07	44		
Cre12.g517900.t1.1	Proteína SecA asociada a cloroplasto	114.00	5	2029.16	32.72	29	1.25	30		

Tabla 3: Identificación de proteínas en la banda señalada en la Fig. 13A mediante espectrometría de masas. Las 5 primeras proteínas identificadas se enumeran según su rango (rk) para cada cepa. Se muestran la puntuación y cobertura de las proteínas y el número de péptidos identificados, que también corresponden a péptidos específicos. Los valores "emPAI" que indican el "Índice de abundancia de proteína modificado exponencialmente" y el número de espectros totales (específicos) observados ("recuentos espectrales", relevantes y duplicados) pueden servir para dar una estimación de la abundancia relativa de una proteína en una muestra.

- 5 Los inhibidores de LOX impidieron la formación de reservas de carbono (lípidos y almidón).
- 10 Basándose en resultados actuales, los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que la quinasa STD1 actúa como regulador negativo de la proteína LOX1. De hecho los productos de la lipoxigenasa, las oxilipinas, son precursores de una gran variedad de moléculas de señalización que desempeñan papeles en muchas redes de señalización de respuesta al estrés, al igual que al desarrollo. Para probar esta hipótesis se usó catecol (Sigma Cat # 452637). El catecol es un conocido inhibidor de la lipoxigenasa, que inhibe la actividad de la lipoxigenasa apagando la especie celular de oxígeno reactivo. Se ensayaron inicialmente dos concentraciones diferentes de catecol (5 mM y 10 mM). Con la presencia de catecol 5 mM, la acumulación tanto de TAG como de almidón se inhibió en el mutante *std1* después de 6 días bajo carencia de nitrógeno (Figura 14). El catecol inhibió también la acumulación de TAG en respuesta a la carencia de nitrógeno en las cepas WT, si bien no se observó ningún efecto sobre la acumulación de almidón. Se ensayan otras condiciones.
- 15
- 20 De lo anterior, parece que la inactivación de STD1 en el mutante *std1* provoca una regulación al alza de LOX1, dando lugar así a la formación de una familia de oxilipinas que están implicadas en las acumulaciones de almidón y TAG, evitando la inhibición de la actividad de LOX por el catecol la acumulación de almidón y de TAG.

REFERENCIAS

- Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J. C., Matagne, R. F., 1990.
5 Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant
Sci. 66, 1-9.
- Becker, W., Joost, H. G., 1999. Structural and functional characteristics
of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. Prog. Nucl. Acid. Res.
Mol. Biol. 62, 1-17.
- 10 Berthold, P., Schmitt, R., Mages, W., 2002. An engineered *Streptomyces*
hygroscopicus aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in
Chlamydomonas reinhardtii. Protist. 153, 401-412.
- Chochois, V., Constans, L., Dauvillée, D., Beyly, A., Solivérès, M., Ball,
S., Peltier, G., Cournac, L., 2010. Relationships between PSII-independent hydrogen
15 bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism
mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Int. J. Hydrogen Energ. 35, 10731-
10740.
- Dauvillee, D., Stampacchia, O., Girard-Bascou, J., Rochaix, J. D., 2003.
Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast
20 *psaB* mRNA. EMBO J. 22, 6378-6388.
- Davies, J. P., Yildiz, F. H., Grossman, A., 1996. Sac1, a putative
regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur
deprivation. EMBO J. 15, 2150-2159.
- Delrue, F., Li-Beisson, Y., Setier, P. A., Sahut, C., Roubaud, A.,
25 Froment, A. K., Peltier, G., 2013. Comparison of various microalgae liquid biofuel
production pathways based on energetic, economic and environmental criteria. Bioresource
Technol. 136, 205-212.
- Goodson, C., Roth, R., Wang, Z. T., Goodenough, U., 2011. Structural
correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas*
30 *reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. Eukaryot. Cell. 10,
1592-1606.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A
multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree
building. Mol. Biol. Evol. 27, 221-224.
- 35 Grossman, A., 2000. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its
nutrient environment. Protist. 151, 201-224.
- Han, J. F., Miranda-Saavedra, D., Luebbering, N., Singh, A., Sibbet, G.,
Ferguson, M. A. J., Cleghon, V., 2012. Deep evolutionary conservation of an
intramolecular protein kinase activation mechanism. Plos One. 7.

- Harris, E. H., 2009. The *Chlamydomonas* sourcebook. Second edition. Academic Press.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621-639.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059-3066.
- Kindle, K. L., 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1228-1232.
- Larkum, A. W. D., Ross, I. L., Kruse, O., Hankamer, B., 2012. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *TiBiotech.* 30, 198-205.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K. M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., Ohlrogge, J., 2010. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book.* 8:e0133. doi: 10.1199/tab.0133. Epub 2010 Jun 11.
- Liu, C. M., Willmund, F., Whitelegge, J. P., Hawat, S., Knapp, B., Lodha, M., Schroda, M., 2005. J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1. *Mol. Biol. Cell.* 16, 1165-1177.
- Malcher, M., Schladebeck, S., Mosch, H. U., 2011. The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 187, 717-730.
- Merchant, S. S., Kropat, J., Liu, B. S., Shaw, J., Warakanont, J., 2012. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Op. Biotechnol.* 23, 352-363.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., Sakai, A., 2001. Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes & Dev.* 15, 1217-1228.
- Peltier, G., Schmidt, G. W., 1991. Chlororespiration - an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4791-4795.
- Ral, J. P., Colleoni, C., Wattedled, F., Dauvillee, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z. Y., Morell, M. K., Chibbar, R., Purton, S., d'Hulst, C., Ball, S. G., 2006. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major

- contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 142, 305-317.
- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R., Cardenas, M. E., 2008. Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 153-160.
- Rumeau, D., Becuwe-Linka, N., Beyly, A., Louwagie, M., Garin, J., Peltier, G., 2005. New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell.* 17, 219-232.
- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A., Beck, C. F., 1999. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell.* 11, 1165-1178.
- Schulz-Raffelt, M., Lodha, M., Schroda, M., 2007. Heat shock factor 1 is a key regulator of the stress response in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 52, 286-295.
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y. H., Peltier, G., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* 11.
- Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., Von Korff, M., Steinhauser, M. C., Keurentjes, J. J. B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A. R., Altmann, T., Stitt, M., 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 10348-10353.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Tolleter, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroustos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J. M., Beyly, A., Cuine, S., Plet, J., Reiter, I. M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., Peltier, G., 2011. Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 23, 2619-2630.
- Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 329, 796-799.
- Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M., Pozueta-Romero, J., 2010. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 952-985.
- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A., Grossman, A. R., 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 117, 129-139.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES
- 5 <120> MICROALGAS VERDES QUE CARECEN DE UN GEN FUNCIONAL DYRKP-1, PARA USO EN EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE MATERIAS PRIMAS
- <130> VMAahF263/604EP
- 10 <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 1278
- <212> PRT
- <213> Chlamydomonas reinhardtii
- <220>
- 20 <223> DYRKP-1
- <400> 1
- Met Ser Ala Thr Gly Gly Gln Ser Glu Gly His Val Ala Pro Pro Glu
 1 5 10 15
- Pro Met Ser Leu Asp Thr Leu Asn Phe Val Val Asn Phe Leu His Ser
 20 25 30
- Ser Gly Phe His Lys Ala His Ser Ala Leu Leu Gln Glu Phe Ser Thr
 35 40 45
- Arg Leu Asn Pro Thr Ala Glu Gly Ala Leu Phe Ala Ala Ala Arg Thr
 50 55 60
- Ser Val Ser Ala Cys Ser Ala Pro Pro Ser Thr Ser Glu Tyr Val Glu
 65 70 75 80
- Arg Ala Leu Glu Ala Leu Ser Pro Pro Arg Ser Lys Ser Ala Gln Ala
 85 90 95
- Gly Pro Ser Trp Glu Gly Phe Pro Gly Pro Ala Ala Gln Pro Lys Ala
 100 105 110
- Gln Ser Thr Ala Gly Ala Val Glu Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro
 115 120 125
- Pro Pro Ser Lys Pro Ala Thr Pro Val Ser Pro Pro Thr Thr Ala Pro
 130 135 140
- Val Thr Arg Ala Lys Arg Arg Gln Ser Arg Pro Ser Ala Thr Arg Gln
 145 150 155 160

ES 2 645 631 T3

Arg Pro Ala Trp Asp Gly Glu Val Asp Asp Tyr Asp Gly Met Asp Asp
 165 170 175

Pro Gly Tyr Ser Arg Lys Glu Val Pro Asn Pro Ser Arg Phe Ala Glu
 180 185 190

Ile Glu Leu Asp Ala Ala Ser Gly Asp Glu Gly Ser Glu Arg Gln Tyr
 195 200 205

Phe Met His Gln Pro Gly Asp Leu Asn Tyr Asp Asp Ile Glu Ser Glu
 210 215 220

Val Ser Ala Ser Asp Leu Glu Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ser Val Gln
 225 230 235 240

Ser Gly Asn Tyr Thr Gly Gly Asp Thr His Asp Glu Thr Trp Asp Phe
 245 250 255

Gly Pro Ile Asp Ile Lys Phe Ala Glu Pro Val Ser Thr Pro Ser Lys
 260 265 270

Ser Pro Glu Lys Gln Glu Ala Glu Glu Arg Arg Pro Val Leu Ser Arg
 275 280 285

Val Glu Ser Leu Ser Ser Ser Phe Lys Asp Phe Glu Met Glu Arg Gly
 290 295 300

Phe Glu Ala Asp Gly Glu Gly Gly Gly Gln Ile Ser Ser Lys Val Ser
 305 310 315 320

Glu Ala Glu Tyr Ala Ala Asp Pro Glu Val Ile Asp Phe Pro Val Pro
 325 330 335

Val Pro Ala Val Asn His Glu Asp Val Glu Leu Phe Arg Asn Gln Arg
 340 345 350

Arg Pro Ser Pro Thr Ser Ser Met Asp Val Ala Ala Gly Ser Leu Ala
 355 360 365

Pro Ser Val Ala Pro Ser Glu Gln Gln Pro Ser Glu Ser Thr Gly Ser
 370 375 380

Gln Glu Arg Gln Arg Lys Gly Thr Gly Lys Ser Thr Ser Leu Leu Lys
 385 390 395 400

Ser Leu Ala Gly Arg Ser Ala Asp Ala Arg Asp Gly Ala Gly Leu Thr
 405 410 415

ES 2 645 631 T3

Leu Gly Ser Ser Ala Leu Ser Ser Gly Gly Ala Ser Ser Ser Ala Ala
 420 425 430
 Arg Pro Ser Ala Pro Thr Val Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ser Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Phe Gly Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly
 450 455 460
 Phe Ser Phe Pro Val Thr Pro Pro Thr Ala Asp Glu Pro Asp Gln Arg
 465 470 475 480
 Leu Phe Thr Ser Trp Pro Ser Val Arg Ser Ser Cys Thr Ser Glu Pro
 485 490 495
 Val Ala Met Ser Asp Asp Asp Asn Ala Leu Pro Ala Glu Tyr Ala Asp
 500 505 510
 Asp Glu Tyr Ser Lys Tyr Arg Leu Ser Ser Arg Ser Thr Ser Met Ala
 515 520 525
 Ala Gln Asp Leu Pro Glu Gln Arg Lys Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser
 530 535 540
 Gly Thr Leu Ala Ser Pro Asp Gly Asn Ser Ala Ala Gly Ser Gly Thr
 545 550 555 560
 Ala Arg Gln Ala Gly Ala Gly Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ala Ala Asp
 565 570 575
 Leu Asp Phe Ser Leu Glu Trp Glu Phe Arg Pro Pro Leu Ser His Glu
 580 585 590
 Ser Arg Glu Pro Ser Leu Glu Phe Ser Thr Ala Asn Thr Asp Asp Glu
 595 600 605
 Gly Leu Gly Thr Pro Lys Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 610 615 620
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asn Glu Val Ser Ala Val Leu Thr
 625 630 635 640
 Leu Glu Pro Thr Pro Ser Ala Ser Ala Gly Val Ala Ala Ala Ala Ala
 645 650 655
 Pro Ala Pro Ala Ala Gly Ser Gly Pro Gly Gln Glu Pro Glu Val Glu

ES 2 645 631 T3

660					665					670					
Gly	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Ala	Gly
		675					680					685			
Glu	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Gln	Leu	Met	Pro	Gln	Leu
	690					695					700				
Ala	Leu	Ile	Asp	Asp	Ala	Asp	Ala	Gly	Ser	Lys	Pro	Gly	Thr	Pro	Val
705					710					715					720
Asp	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Val	Ala	His	Arg	Ile
				725					730					735	
Asn	Phe	Glu	Ser	Glu	Asp	Leu	His	Asp	Ala	His	Ser	His	Asp	Gly	Gly
			740					745					750		
Ala	Ser	Val	His	Ser	Ala	Pro	His	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Val
		755					760						765		
Pro	Glu	Pro	Leu	His	Glu	His	Glu	His	Glu	Arg	Asp	Asp	Gln	Ser	Ser
	770					775					780				
Ile	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Ala	Glu	Ala	Asp	Asp
785					790					795					800
Glu	Asp	Thr	Asp	Leu	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Phe
				805					810					815	
Ser	Glu	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Pro
			820					825					830		
Glu	Pro	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Asp	Glu	Glu	Arg	Leu	Gly	Gly	Asp
		835					840						845		
Glu	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu
	850					855					860				
Asp	Glu	Ala	Gly	Arg	Arg	Ser	Ser	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Val	Gly	Ala
865					870					875					880
Gly	Gly	Glu	Trp	Gly	Asp	Glu	Gln	His	Leu	Arg	Ala	Pro	Asp	Ala	Lys
				885					890					895	
Asp	Ile	Ala	Arg	Ala	Arg	Pro	Glu	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Arg	Tyr	His
			900					905						910	

ES 2 645 631 T3

Met Asp Glu Gln Gly Asn Val Leu Tyr Glu Tyr Asp Pro Asp Tyr Ile
 915 920 925

Asp Arg Lys Tyr Glu Val Phe Glu Leu Arg Val Ile His Arg Arg His
 930 935 940

Arg Thr Gly Phe Glu Glu Thr Lys Asp Phe Pro Ile Arg Leu Asn Asp
 945 950 955 960

Leu Ile Ala Gly Arg Tyr Gln Val Met Asp Phe Leu Gly Ser Ala Ala
 965 970 975

Phe Ser Arg Ala Val Gln Ala Leu Asp Ile Lys Thr Gly Gln Leu Val
 980 985 990

Cys Leu Lys Ile Ile Lys Asn His Lys Asp Tyr Phe Asp Gln Ser Leu
 995 1000 1005

Asp Glu Ile Lys Leu Leu Lys Tyr Val Asn Thr Met Asp Pro Asn
 1010 1015 1020

Asp Glu Tyr Ala Ile Val Arg Leu Tyr Asp Phe Phe Tyr Tyr Lys
 1025 1030 1035

Glu His Leu Phe Leu Val Cys Glu Leu Leu Arg Ala Asn Leu Tyr
 1040 1045 1050

Glu Phe Gln Lys Tyr Asn Lys Glu Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Phe
 1055 1060 1065

Thr Asn Ala Arg Ile Gln Arg Ile Ala Arg Gln Ala Leu Arg Ser
 1070 1075 1080

Leu Ala Phe Leu His Ser Leu Gly Leu Ile His Ser Asp Leu Lys
 1085 1090 1095

Pro Glu Asn Ile Leu Ile Lys Ser Tyr Ser Arg Cys Glu Val Lys
 1100 1105 1110

Val Ile Asp Leu Gly Ser Ser Cys Phe Ile Thr Asp Gln Leu Ser
 1115 1120 1125

Ser Tyr Val Gln Ser Arg Ser Tyr Arg Ala Pro Glu Val Ile Leu
 1130 1135 1140

Gly Leu Pro Tyr Asp Tyr Lys Val Asp Val Trp Ser Leu Gly Cys
 1145 1150 1155

ES 2 645 631 T3

Ile Leu Ala Glu Leu Ser Ser Ser Phe Val Leu Phe Gln Asn Asp
 1160 1165 1170

Ser Leu Ser Thr Leu Leu Ala Arg Leu Glu Gly Ile Leu Gly Pro
 1175 1180 1185

Val Pro Glu Trp Met Leu His Lys Gly Arg Tyr Ala His Arg Phe
 1190 1195 1200

Tyr Thr Arg Ser Gly Met Leu Tyr Glu Arg Asn Ala Thr Thr Gln
 1205 1210 1215

Lys Tyr Asp Met Leu Gln Pro Lys Arg Thr Ser Leu Arg His Arg
 1220 1225 1230

Met Pro Asp Ala Asp Glu Gly Leu Leu Glu Phe Val Gly His Leu
 1235 1240 1245

Leu Thr Val Asp Pro Arg Lys Arg Pro Thr Ala Ala Glu Ala Leu
 1250 1255 1260

Lys His Pro Trp Leu Gln Gln Glu Tyr Pro Ser Leu Asp Ser Met
 1265 1270 1275

- <210> 2
- 5 <211> 5200
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia de ADNc de DYRKP-1 que incluye 5' UTR y 3' UTR

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (165)..(167)
- 15 <223> Codón de inicio

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (3999)..(4001)
- 20 <223> Codón de terminación

- <400> 2
- gtattcaata accacaggta ccttacttac cagacttgct atcacgggtcc tcggtgacct 60
- ctgaagtcgt cgagatgggt gtgcctgaac ctagtggcc aaggctcgtt tgagaggggc 120
- ttgccatagt gctcagcagg ggacaaggcc cgcaagtggc caaaatgtca gcaacggggg 180
- gccaaagtga gggccatgtc gctccgcctg aaccgatgtc gctggatacg cttaatTTTg 240
- tcgtgaactt tctccattcg tccgggttcc acaaggcgca cagcgcactg ctccaggagt 300

ES 2 645 631 T3

tcagcacgcg gctgaacccc accgcggaag gagcgcctctt cgcagctgcg cgaacttcgg 360
 tcagcgcttg ttccgctcca ccttccacgt cggagtatgt ggagcgtgcg ctggaggctc 420
 tatctcctcc tcgcagcaag tctgcgcagg cgggaccgag ctgggaagga tttccgggac 480
 cggcagcgca gccaaaggcg cagtccacag ctggtgcagt tgaaagtgcg ccagctcccg 540
 ccccgccacc gccagcaag ccagctacgc ctgtcagccc tccgactacg gctcctgtaa 600
 cacgtgctaa acgtcgacaa tccaggccct cggctacccg gcaacgacct gcctgggacg 660
 gagaggtgga tgactacgat ggcatggacg acccgggcta tagccggaag gaggtgccga 720
 acccgtcgcg ettcgcggag attgagctcg acgctgcaag cggcgacgag gccagcgcgc 780
 ggcaatactt catgcaccag cccggcgacc tcaactatga tgatatcgag tcagaggtgt 840
 ccgcctcggg cctggagggc atcaccgcag ccagcagcgt gcagtcgggg aactacacag 900
 ggggtgacac gcacgacgaa acctgggact tcggcccat agatatcaag ttcgcggagc 960
 cggtcagcac gccagcaag agcccggaga agcaagaagc ggaggagcgg cggccggtgc 1020
 tttcgcgcgt ggagtcgctc agcagctctt ttaaggactt cgagatggag cggggctttg 1080
 aggcagacgg cgagggcggg ggccagatct catcaaagggt gtcggagcgg gactacgcag 1140
 cggaccggga ggtgatgac ttccctgtgc cgggtccggc ggtgaaccat gaggacgtgg 1200
 agctgttccg caaccagcgg cggcccagcc ccacgtcctc catggacgtg gccgcggct 1260
 cgctggcgc gtccgtagca ccctcggagc agcagccttc cgaaagcacg gccagtcagg 1320
 agcggcagcg caagggcacg ggcaagagca cttcgctgct caagtgcctg gccgggcggt 1380
 cagcggacgc tcgcgacggt gccggcctga cgctgggtag cagcgcctc agcagcgtg 1440
 gcgccagtag ctctcggcg cgaccagcg cacccaggt aggcaccggc gccgcgctt 1500
 ccggtggtgg cgggttcggc ggtgcccgtt ttggcggcgg cggtttggc gccggcttca 1560
 gcttcccggg gacgccgcc accggcgatg agccagacca gccgctgttc acgtcgtggc 1620
 ctccgctccg cagcagctgt acgtcagagc cgggtggccat gtcggacgac gacaacgcgc 1680
 tgccggccga gtacgaggac gacgagtact cgaagtaccg gctcagcagc cgcagcacgt 1740
 ccattggcggc gcaggacctc ccggagcagc gcaaaaccgc ggacggcgaa acctctggca 1800
 cgcttgccag ccccgatggc aactccgcgg ccgggtcagg cacggcgcgg caggccggcg 1860
 ccggcgcgcc tgccgcagac gccgccgcag acctggatit ctgcctggag tgggagttcc 1920
 ggccgcgct cagccacgag tcgcgggagc cgtcgcctgga gttctccaca gccaacacgg 1980
 acgacgaggg gctggggaca cccaaggcgg tcgcggcggc gccagctgcc gccgcgccg 2040
 ccgcgctgc gggcggcgcg aacgaggtca gcgcggtgct cacactggag ccgacaccgt 2100
 cggcgtcagc ggggtggtcc gcggcggcgg cgcagcgcgc gcccgctggg tccgggccgg 2160
 ggcaggagcc ggaggtcgag ggcggcgcgc tgctggacac gcacaacggc tcggtgacgc 2220

ES 2 645 631 T3

tggcgggga ggtggaggcg gcggcggcgc agctggtgca gctgatgccg cagctggcgc 2280
 tcacgcagca cgctgacgcc ggcagcaagc cgggcacgcc ggtggacgcg ctggagcggg 2340
 aagactcctc ccaagtgtg gcgcaccgca tcaacttcga gtcggaggac ctgcacgacg 2400
 cccactccca cgacggcggc gcctccgtgc actccgcgcc gcacatcggc gcggcccgcg 2460
 aggccgtgcc cgaacccttg cagcagcacg aacacgagcg cgacgaccag tccagcatca 2520
 gcgccgccat cgccggcgtg gaggtccgcg cggaggcggg tgacgaggat acggacctgg 2580
 gtgaggatgg cgttgccgca gcggcgtctt tttccgagcc ggctcgtac gatgccgatg 2640
 acgccgacgt ggatgagccg gagccgctgt cggggctggc ggatgatgag gagcggctgg 2700
 gcggcgacga ggatgatgat gaggacgatg aagatgacga ggacgaggac gaggaggacg 2760
 aggccgggag acgcagcagc ggcggcgtgg tgggcgttgg cgcggcggc gagtgggcg 2820
 acgagcagca cttgcgcgcg ccggacgcca aggacattgc ccgcgcgcgg cccgagtcca 2880
 gcctgacgcc ccgctaccac atggacgagc agggcaacgt gctgtacgag tacgacctg 2940
 actacatcga ccgcaagtac gaggtgtttg agctgcgcgt catccaccgc cgccaccgca 3000
 ccggcttcga ggagaccaag gacttcccca tccgcctcaa cgacctata gcgggcaggt 3060
 accaggtgat ggacttctcg ggctccgccc ccttcagccc cgcggtacag gcgctggaca 3120
 tcaagacggg gcagctgtg tgcctcaaga tcatcaagaa ccacaaagac tactttgacc 3180
 agtcgctgga cgagatcaag ctgtcaagt acgtcaacac catggacccc aacgacgagt 3240
 acgccatcgt gcgcctgtac gacttcttct actacaagga gcacctgttc ctggtgtgcg 3300
 agctgctgcg gcccaacctg tacgagttcc agaagtacaa caaggagtcc ggcgacccgg 3360
 cctacttcac caacgcgcgc atccagcgca tcgcgcgga ggcgctgcgc tcgctggcgt 3420
 tcctacaetc gctggggctg atccactccg acctcaagcc cgagaacata ctcatcaaga 3480
 gctacagcag gtgtgaggtc aaggtgattg acctgggctc ctctgcttc atcacggacc 3540
 agctcagcag ctacgtgcag agccgctcct accgcgcgcc ggaggtcac ctgggtctgc 3600
 cctacgacta taaggtggac gtgtggtctc tgggctgcat cctggcggag ctgtccagca 3660
 gctttgttct tttccagaac gactcgtctg ccacgctgct ggcgcggctg gagggcattc 3720
 tgggccccgt gcccgagtgg atgtgcaca agggccgcta cgcgcaccgc ttctacagc 3780
 gcagcggcat gctgtacgag cgcaacgcca ccaccagaa gtacgacatg ctgcagccca 3840
 agcgcacctc gctgcggcac aggatgccgg acgcggacga ggggctgctg gaggctcgtg 3900
 gccacctgct gacgggtggac ccgcgcaagc gccccaccgc cgcgaggcg ctcaagcacc 3960
 cctggctgca gcaggagtac ccctcgctcg acagcatgta ggcgggcggc ggacagtggc 4020
 ggccagtggc gcaagcgctg gcgctggggc cgcgctaagg ggtgctgcag cagcaggacc 4080

ES 2 645 631 T3

agcagagcgg aggccggcgg cagaggccgg gatggggccc gcggcagttt caggcagcaa 4140
 gcggaaaccc gcaaggcttg acaacaactg ttttgtgggt ggggtgggtaa tgcgggcttc 4200
 cagagtggac ttcagcattt ggggttctgg ggtcagaggg ctacaggctg gctgctttgg 4260
 agaggattgg gcggtcatag gggcacatac gtattgtttg tgcagtcaca ggcggctttc 4320
 aggctcgggc gggagaagtt actgcatggc atagtacgca gaggaaggaa taggggcgtg 4380
 cattcggagg cgtgcggcag acagcgcggg ctgacgtcaa ccggcggctg tgtgctcgtg 4440
 cgcggaaggc ggttctgctg ttgcgcacat gggtcattat cattcgacac gtatcaggcg 4500
 acgtcggcac acaatcgagg ccgaggtatt ggcctcccca ccaagcaagg agtcaggaag 4560
 ggcccaaaga gatctcacgc gagtgacgtg cgagtcctgt tgcctacctg gtgtgcaagt 4620
 tatctacgcc gcatggggac tcccgcggct gtgccgcgtc tgcgcgcgca acattgcaac 4680
 ataccggtgc gcacgtttgc acccggtttt tcagatgaag tttgggttca agtgcggggt 4740
 agcggctcag cgggtcttcg catctacatg tcctggcgga agagtgcgtg tctggtgtcg 4800
 agtcatcgcg ggggcatgcg cagaccgttt gccagggggc tggggccctg cgatgcgaag 4860
 gcaacgaaca agtgtgctg ggctgggtgt gtgtgtgcat gtgtcagggt gtgcttgcg 4920
 gcgcgctcgt gaatctgtgt tgtgttggtg tatgcatgaa cgcggtggcg tggcagctca 4980
 catgtaagt gctgtgtgga ggccctgggc agaatcagcg aagcgggtgtg gtgtcattga 5040
 aggtcaagct gtgcaaccca gtaacagga cgaccccgca gggagagggg cgccatggta 5100
 gctgggcagg actggggaag gtggcggcat atcactgaga gtatgtagcg cgtcgacagg 5160
 gggcaacggc caacacgccc tcgtgtaaca cattacagc 5200

5 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> proteína DYRK

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = R o K

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = cualquiera

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = D, E o N

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = F o L

<400> 3
 His Xaa Thr Gly Phe Glu Glu Xaa Lys Xaa Xaa
 1 5 10

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223>cebador

<400> 4
 cgaagcatgg acgatgcgtt 20

15 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223>cebador

<400> 5
 cgagactgcg atcgaacgga ca 22

25 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223>cebador

<400> 6
 ctgggtgctgc gcgagctggc ccacgaggag 30

35 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223>cebador

45 <400> 7
 tggttcgggc cggagtgttc cgcgcgctt 29

50 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223>cebador

55 <400> 8
 gtctagaatg tcgctccgcc tgaaccgatg 30

60 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223>cebador

<400> 9
 gtctagacta catgctgtcg agcgagg 27

5 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223>cebador
 <400> 10
 catatgctc agcaggggac aaggc 25

 15 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223>cebador
 <400> 11
 agcgtgccag aggttcgcc gtc 23

 25 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223>cebador
 <400> 12
 ccgcgacgg cgaaacctct ggcac 25

 35 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223>cebador
 <400> 13
 gatctcgcc agcgactggt caaagtag 28

 45 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223>cebador
 <400> 14
 gcggatccga cgagcagggc aacgtgctg 29

 55 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223>cebador
 <400> 15
 cggcaagctt ctacatgctg tcgagcgagg 30

 65

ES 2 645 631 T3

5 <210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223>cebador

<400> 16
aatcgtgcbc gacatcaagg agaa 24

15 <210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223>cebador

<400> 17
ttggcgatcc acattgctg gaaggt 26

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir materia prima de biomasa, que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar células de microalgas verdes en las que la expresión y/o la actividad de la proteína DYRKP-1 de secuencia SEQ ID N°: 1 está disminuida, pudiéndose obtener dicha disminución mediante silenciamiento, desactivación, mutación y/o interrupción del gen DYRKP-1 o mediante la inhibición de la actividad de la proteína DYRKP-1 mediante compuestos químicos que actúan como inhibidores específicos; y
 - (ii) inducir la acumulación de reservas y/o el aumento en la producción de biomasa por dichas microalgas, que comprende incubar las células de microalgas en un medio deficitario, siendo dicho medio deficitario en al menos un elemento elegido entre el grupo que consiste en nitrógeno, azufre y fósforo.
2. El método según la reivindicación 1ª, en el que dichas microalgas carecen de un gen funcional *DYRKP-1*, cuya secuencia de codificación es SEQ ID N° 2.
3. El método según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en el que dichas microalgas son *Chlamydomonas*.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que dichas microalgas son *Chlamydomonas reinhardtii*.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que la etapa (ii) comprende iluminar las células de microalgas.
6. El método según la reivindicación 5ª, en el que dicha iluminación se realiza a una intensidad comprendida entre 25 y 2000 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 8 a 24 horas al día.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4ª a 6ª, en el que la etapa de incubar las células de microalgas en el medio deficitario dura al menos 24 horas.
8. El método según la reivindicación 7ª, en el que la etapa de incubación de las células de microalgas en el medio deficitario dura de 2 a 8 días, preferiblemente de 3 a 6 días.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, en el que la etapa (ii) comprende incubar las células de microalgas en un medio que comprende carbono orgánico.
10. El método según la reivindicación 9ª, en el que en la etapa (ii) las células se incuban durante 2 a 6 días en un medio deficitario que comprende acetato.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, en el que la etapa (ii) comprende incubar las células de microalgas en condiciones fotoautótrofas.
12. El método según la reivindicación 11ª, en el que en la etapa (ii) las células se incuban durante al menos 15 horas en condiciones fotoautótrofas en un medio deficitario.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9ª a 12ª, en el que la materia prima de biomasa producida es aceite.
14. Método según la reivindicación 11ª o la reivindicación 12ª, en el que la materia prima de biomasa producida es almidón y/o biomasa.

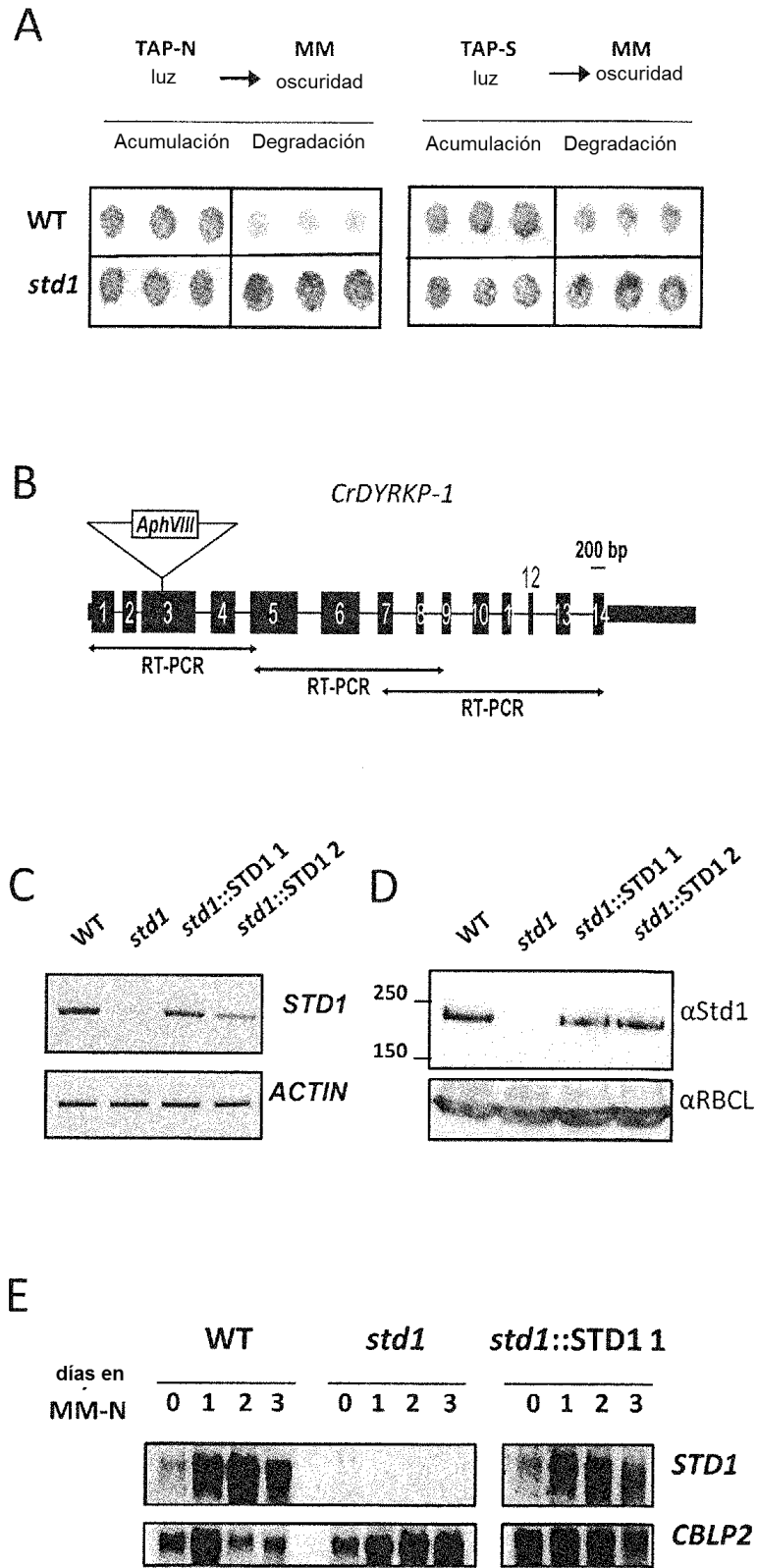
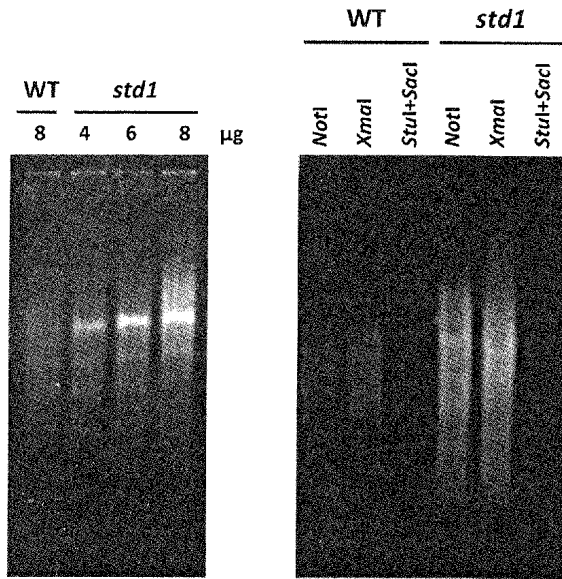
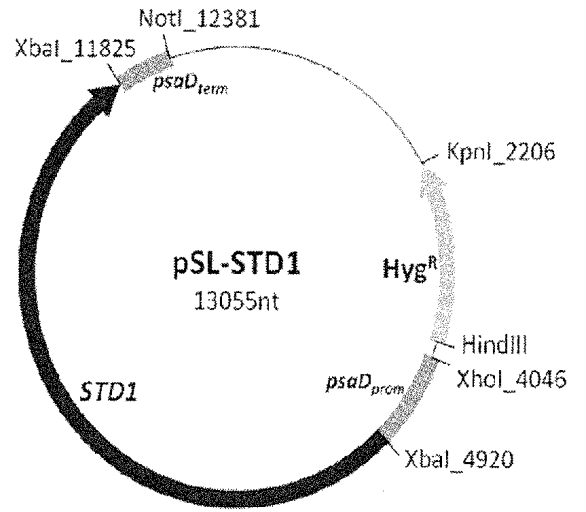


Figura 1

A



B



C

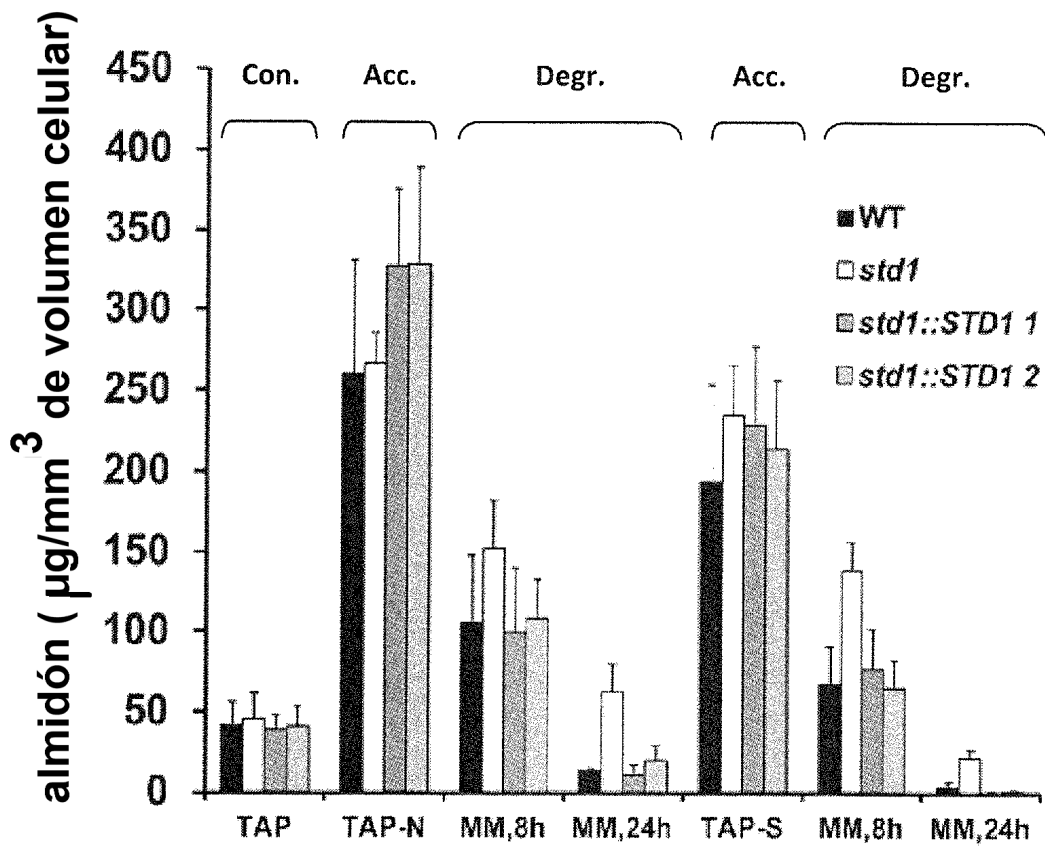
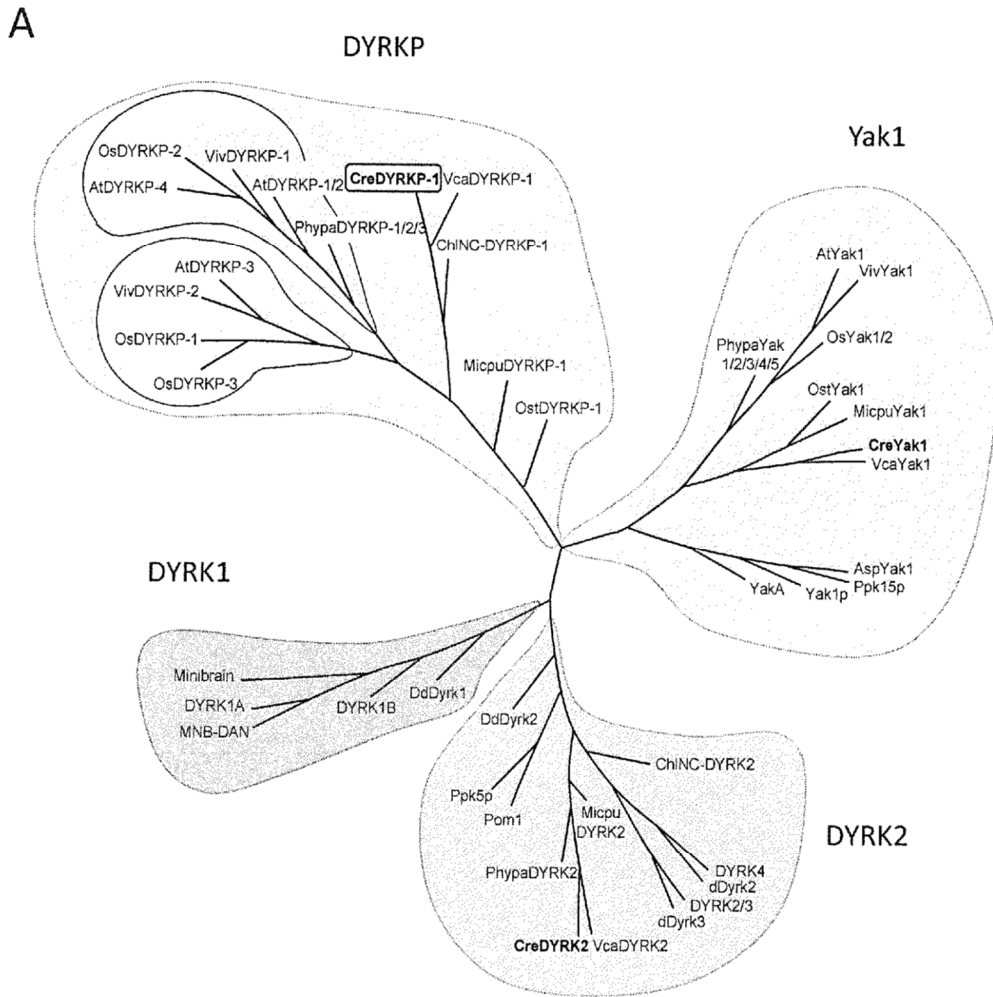


Figura 2



B

Becker and Joost, 1999	N	X	G	Y/F	D	D	D/E	N	X	D	Y	X	X	X	X	D/E
DYRK1	N	D/H	G	Y	D	D	D	N	H/Y	D	Y	I	K/R	N/S	G	E
DYRK2	N	X	G	Y	D	D	D/E	R	G	D/S	Y	X	V	P/L	H/G/R	D
YAK1	N	D/N	G	X	D	N	E	N	X	D	Y/L	I	X	V	N	D/X
DYRK-A	N	R	T	G	F	E	E	D/E	K	N/D	F	N/P/N	V	L	N	S/A
DYRK-B	N	R	T	G	F	E	E	N	K	D/E	F/L	P	V	X	N	S/T
DYRK-algae	H	R/K	T	G	F	E	E	S	K	D/E	F	P	R	#	G	D

Figura 3

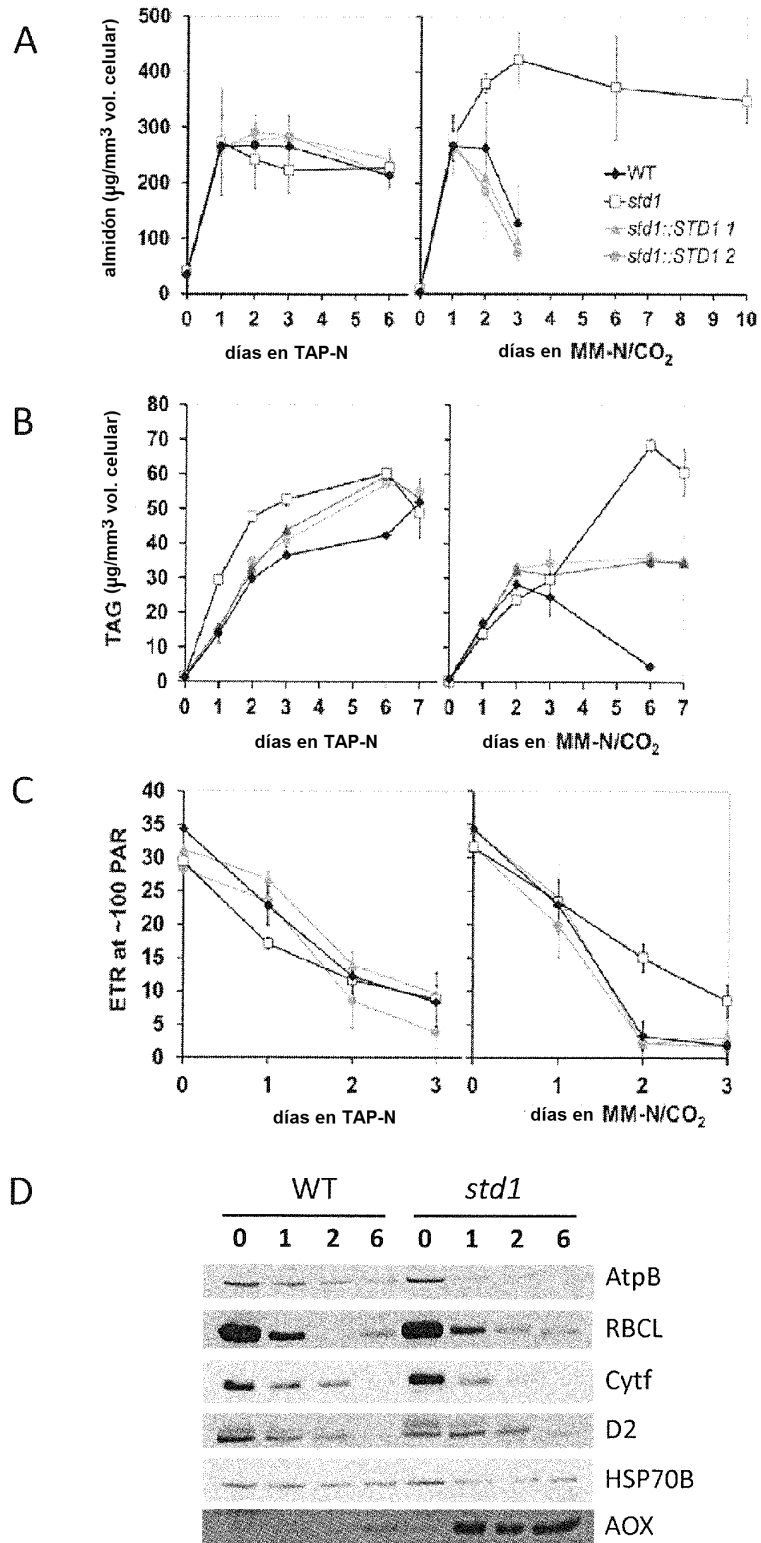


Figura 4

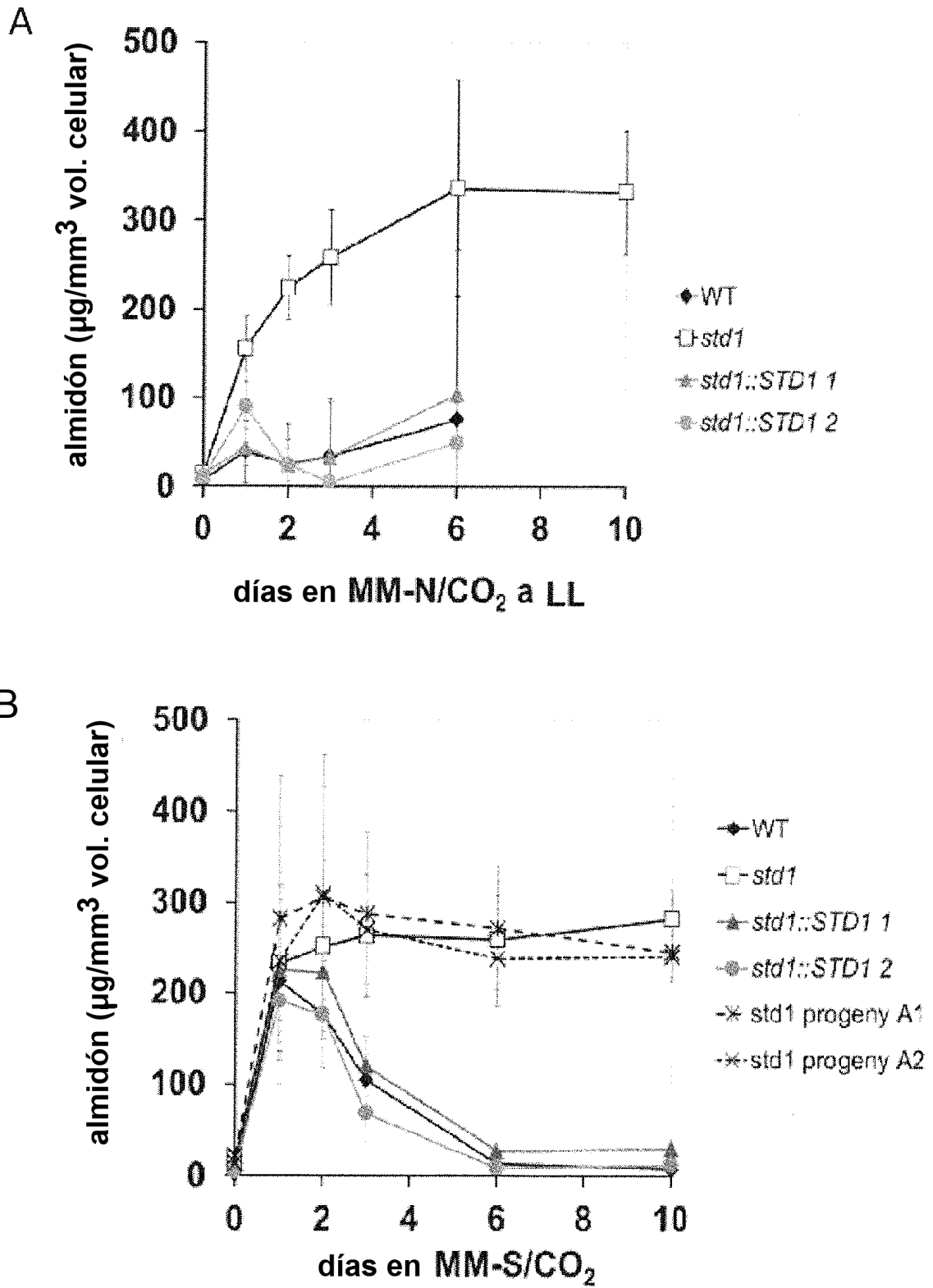
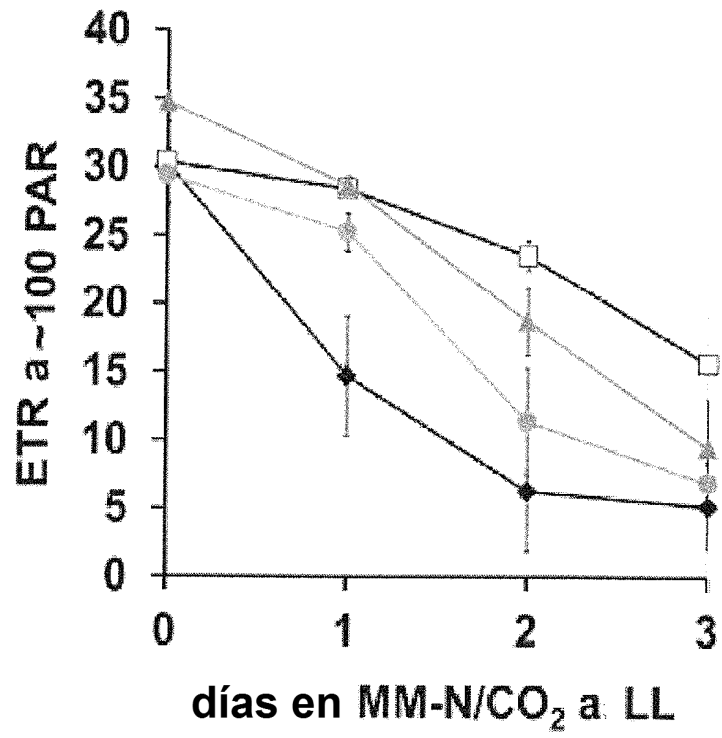


Figura 5 A-B

C



D

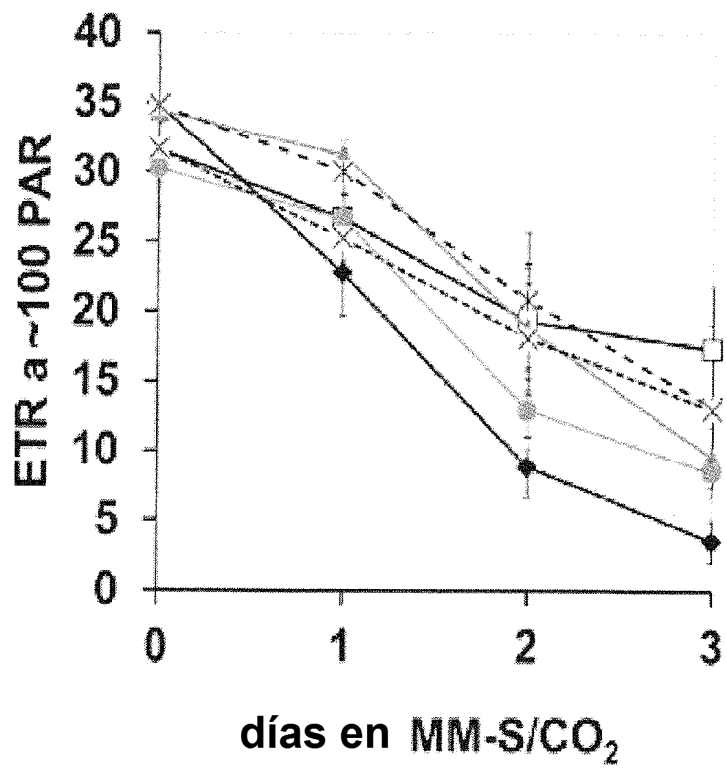


Figura 5 C-D

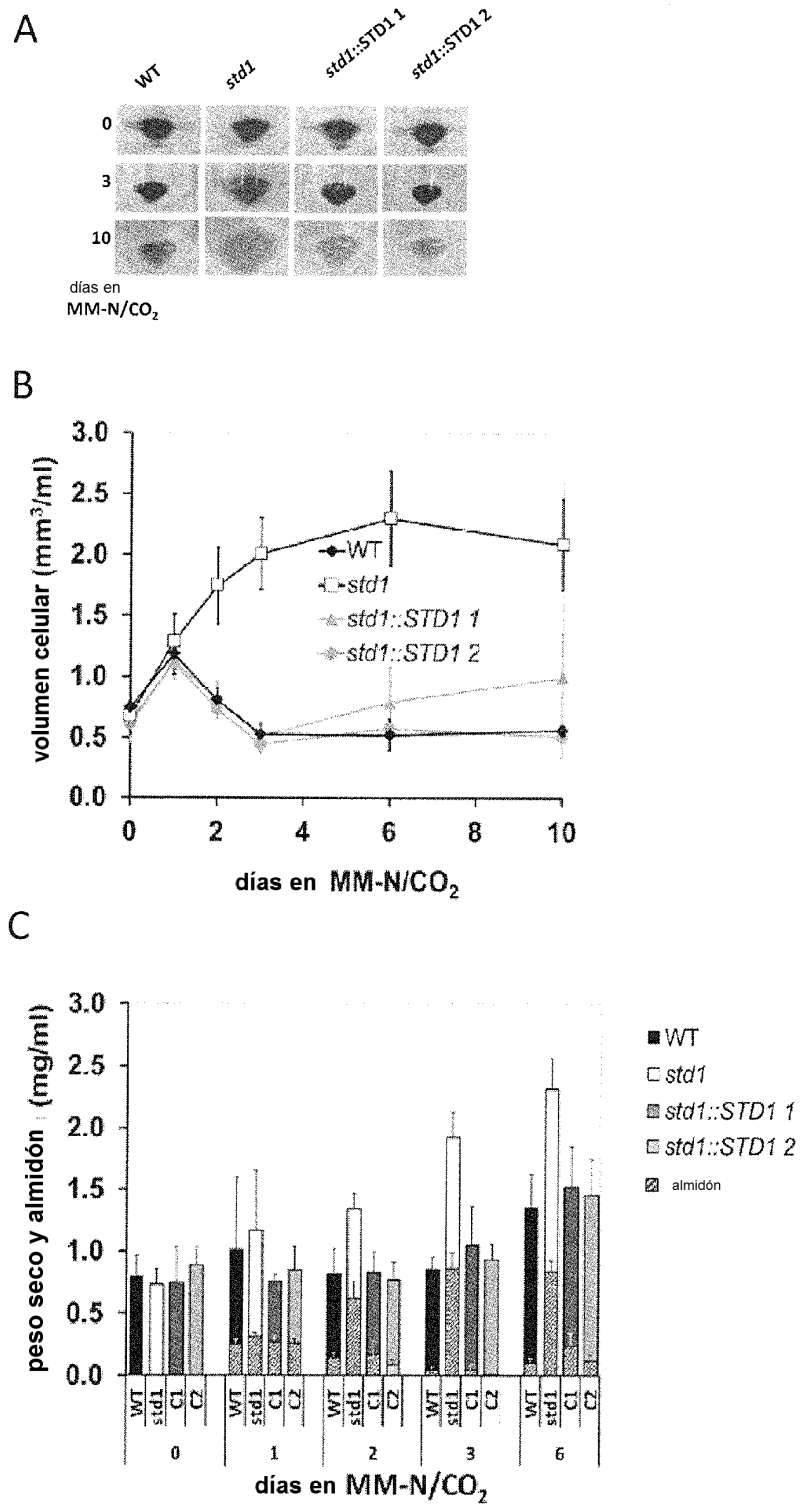


Figura 6

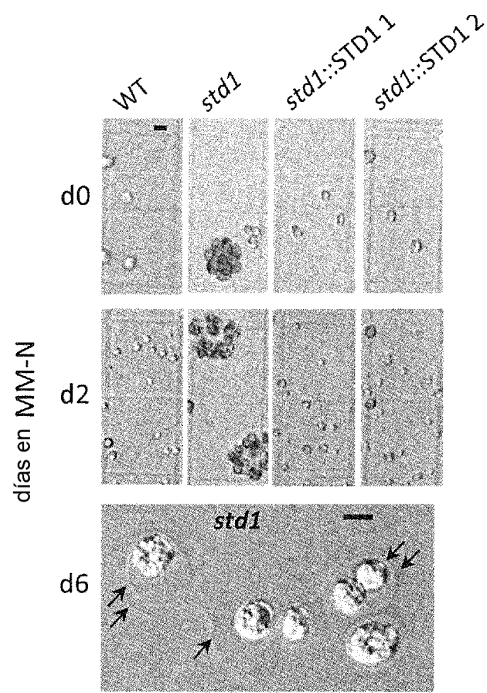


Figura 7A

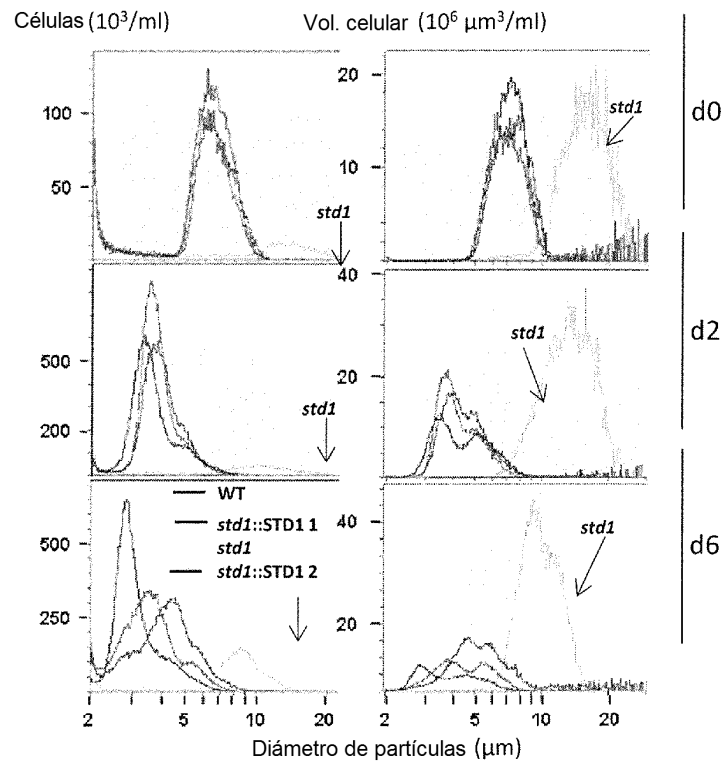


Figura 7B

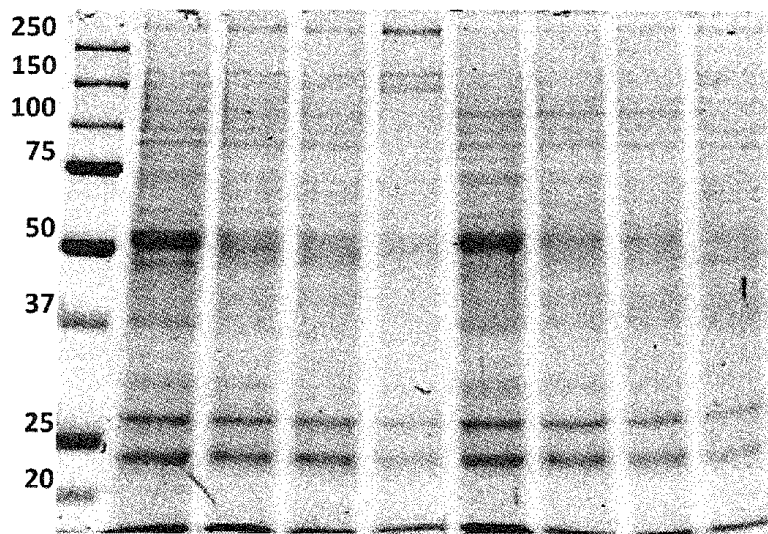


Figura 7C

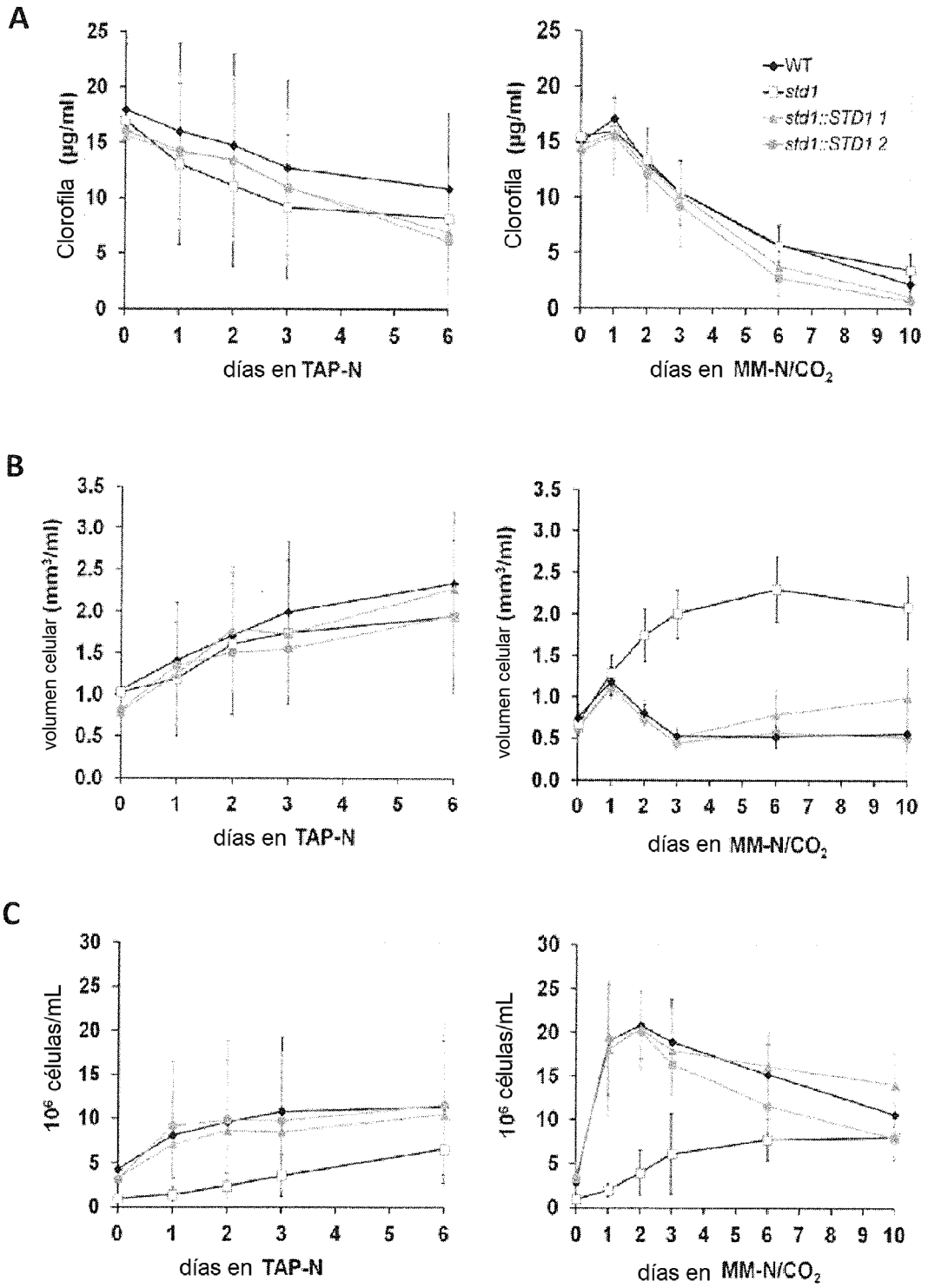


Figura 8

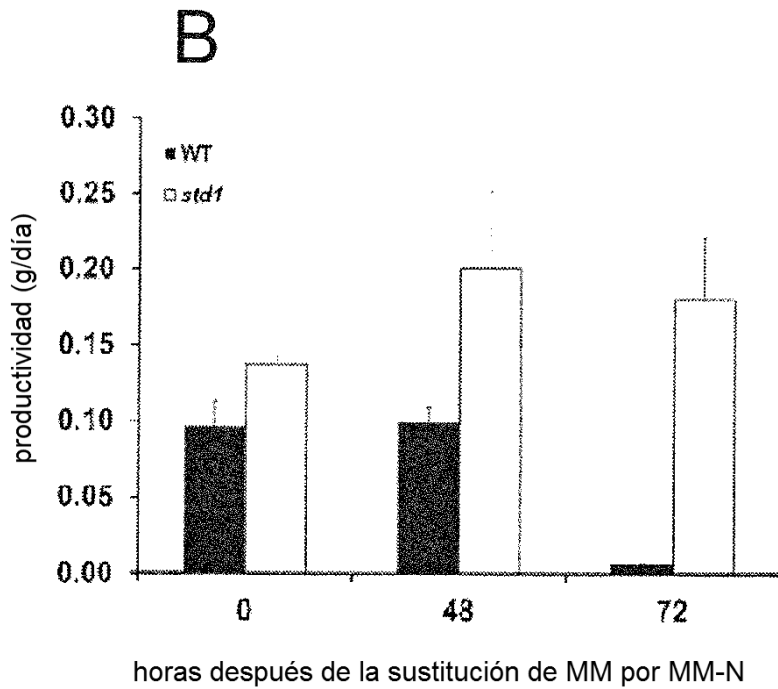
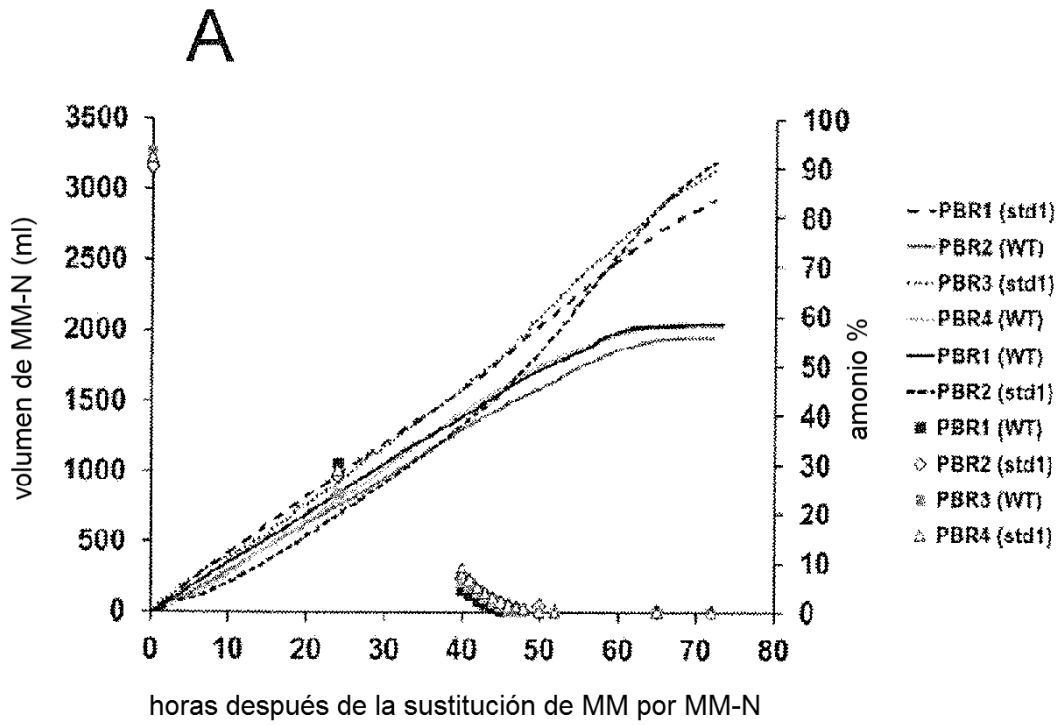


Figura 9

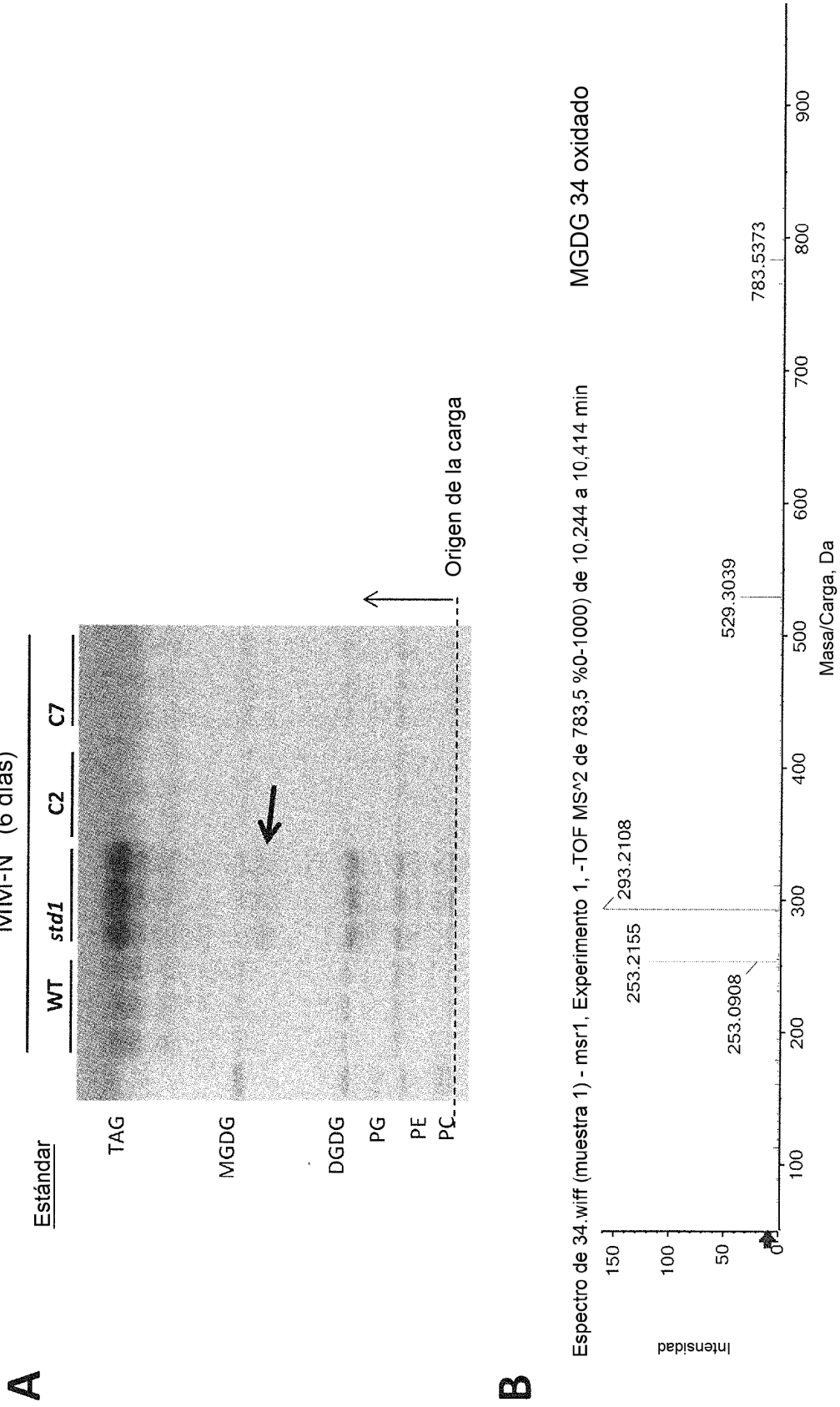


Figura 10

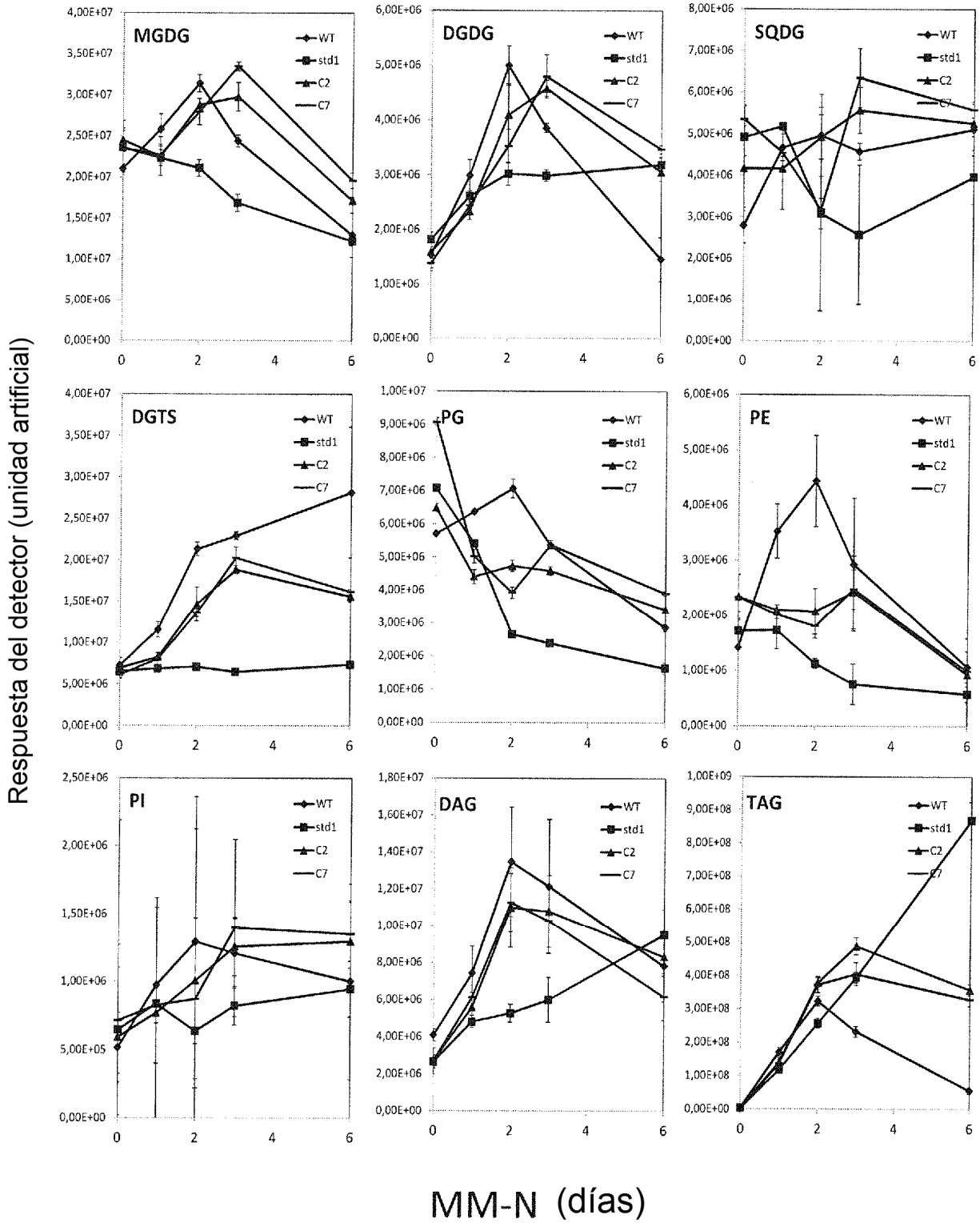


Figura 11

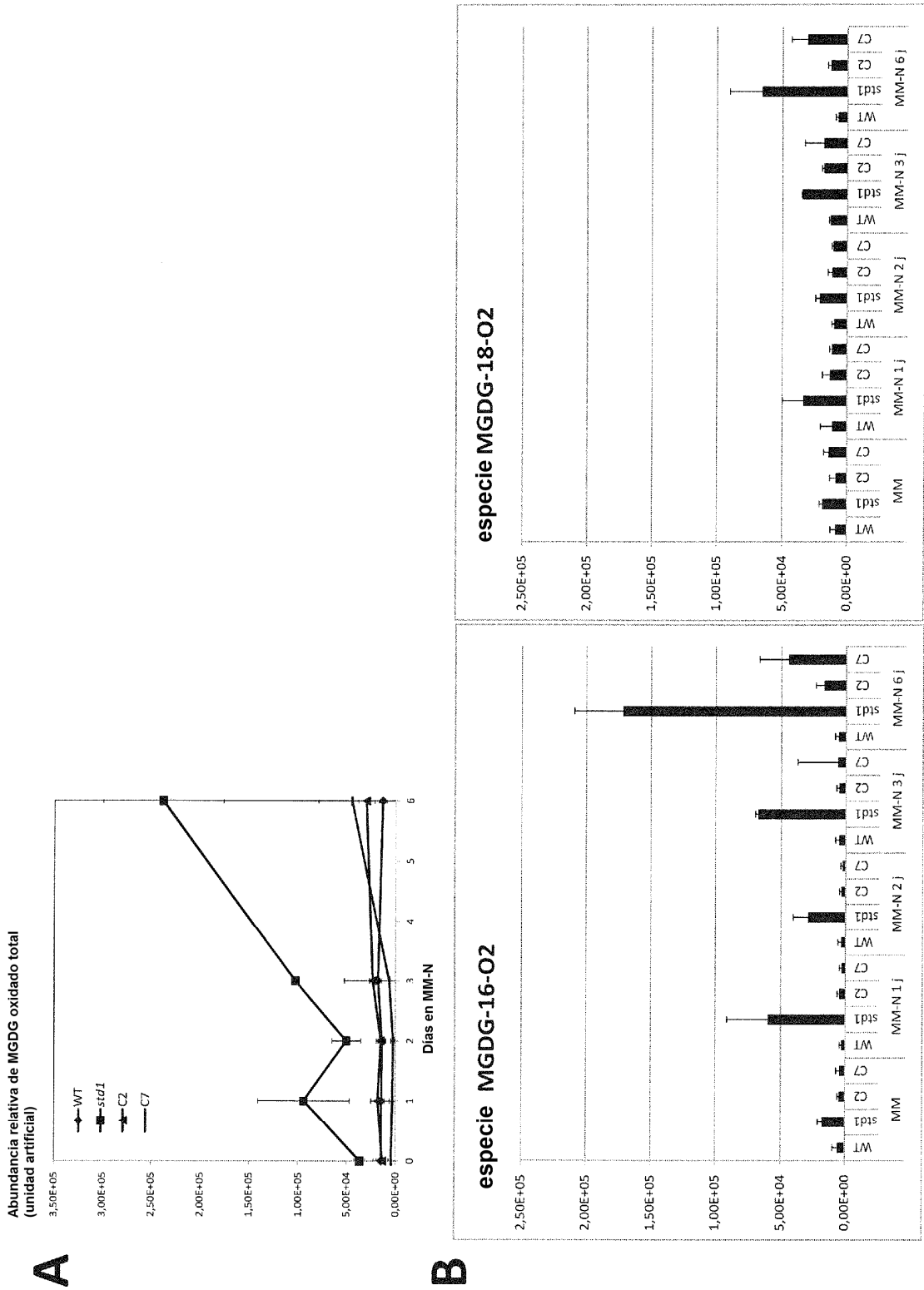


Figura 12

A Fracción insoluble

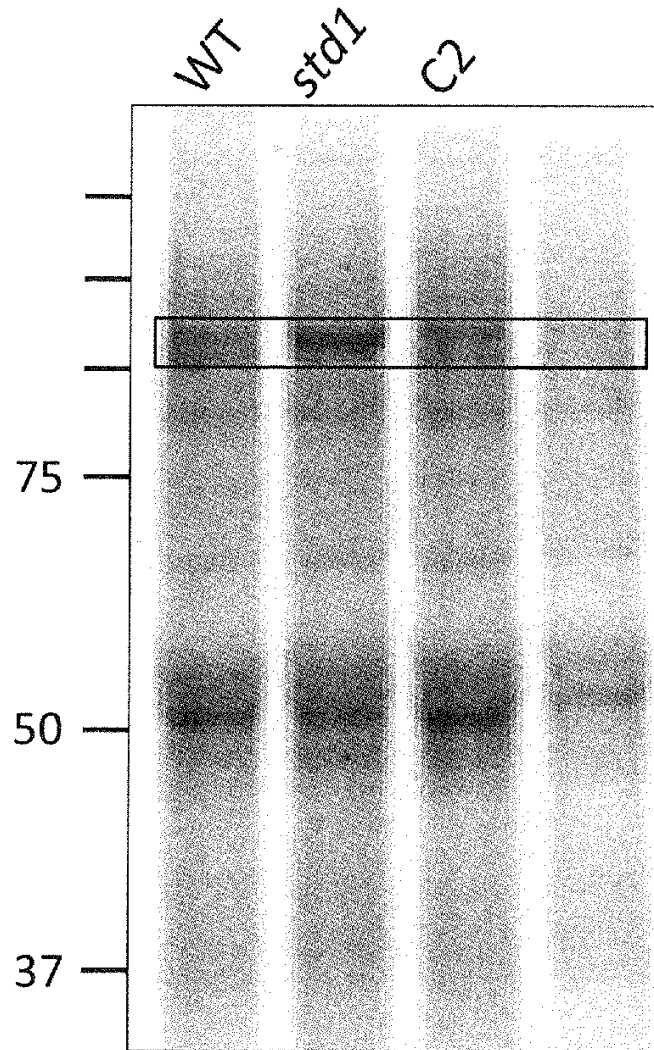
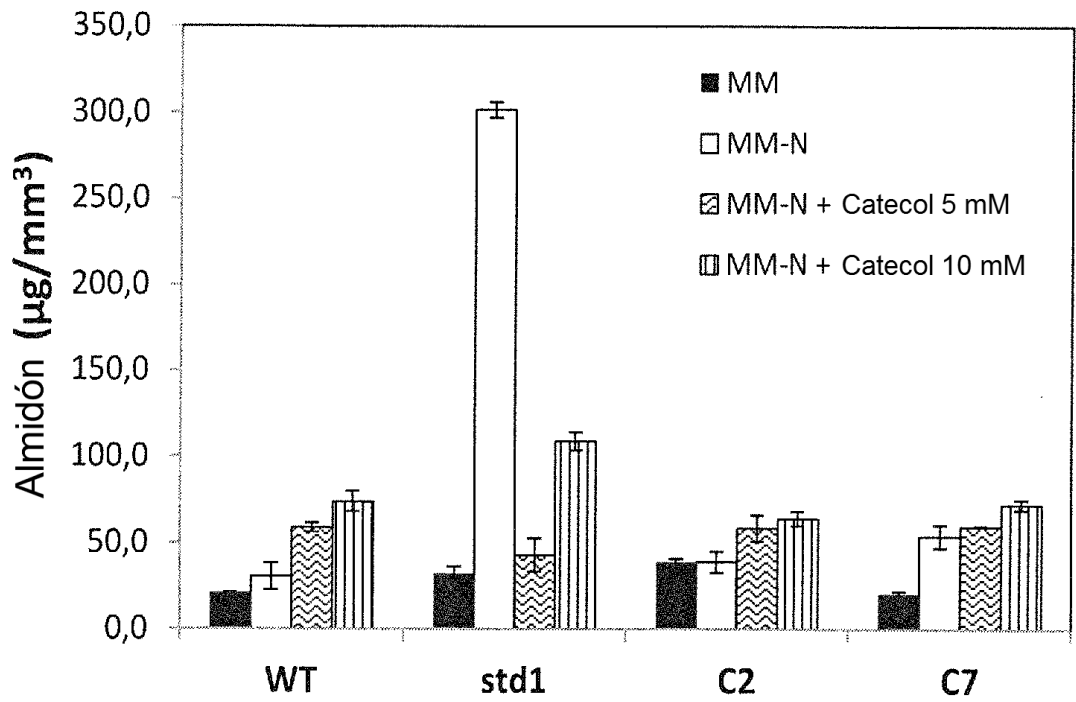


Figura 13

A



B

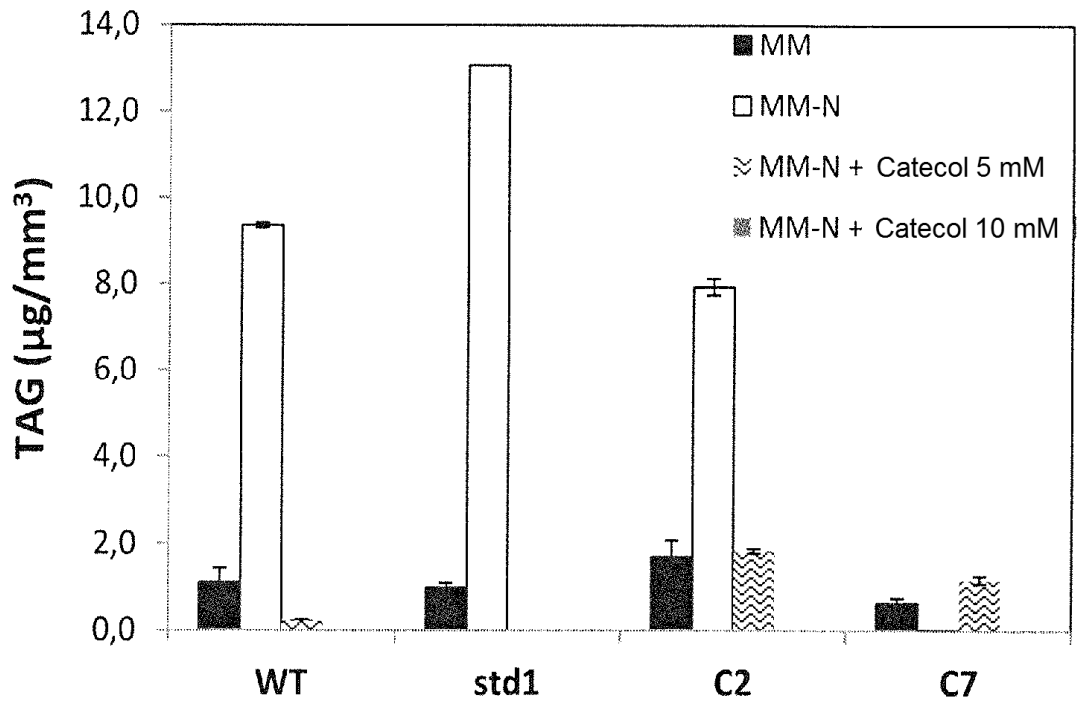


Figura 14