

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 269**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/28** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**A61K 31/202** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 14/405** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 9/20** (2006.01)

**C12N 15/79** (2006.01)

**A23L 33/115** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2015 PCT/US2015/013274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15116671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 15743916 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3099782**

54 Título: **Factores para la producción y acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) obtenidos con PUFA sintasas**

30 Prioridad:  
**28.01.2014 US 201461932310 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.07.2019**

73 Titular/es:  
**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:  
**METZ, JAMES GEORGE;  
KUNER, JERRY M.;  
MCCASKILL, DAVID GLEN y  
FOSTER, MENDY LOUISE**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 721 269 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Factores para la producción y acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) obtenidos con PUFA sintasas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de patente estadounidense nº 61/932.310, presentada el 28 de enero de 2014.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a la identificación y utilización de proteínas factores de potenciación para la mejora de la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) y particularmente a los PUFA de cadena larga (LCPUFA) en un organismo huésped que ha sido modificado genéticamente con un sistema de PUFA sintasa para producir dichos PUFA. Asimismo, la presente invención se refiere a los organismos que han sido modificados genéticamente para expresar dichas proteínas factores potenciadores o que han sido modificados con respecto a dichas proteínas, y a métodos de preparación y utilización de dichos microorganismos.

20 Antecedentes de la invención

Se considera que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) resultan útiles para aplicaciones nutricionales, aplicaciones farmacéuticas, aplicaciones industriales y otros fines. Sin embargo, el suministro actual de los PUFA a partir de fuentes naturales y de la síntesis química no resulta suficiente para las necesidades comerciales. Los PUFA derivados de microorganismos tales como microalgas pueden producirse a gran escala, evitando simultáneamente problemas de contaminación asociados a los aceites de pescado.

25

Los sistemas de policétido sintasa (PKS, por sus siglas en inglés) son generalmente conocidos de la técnica como complejos enzimáticos relacionados con los sistemas de ácido graso sintasa (FAS), pero que con frecuencia son altamente modificados para producir productos especializados que típicamente muestran pocas similitudes con los ácidos grasos. Sin embargo, ahora se ha mostrado que los sistemas de tipo policétido sintasa existen en bacterias marinas y en determinadas microalgas que son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a partir de acetyl-CoA y malonil-CoA. Estos sistemas se denominan en la presente memoria PUFA sintasas, sistemas de PUFA sintasa, sistemas de PUFA PKS o sistemas de tipo PKS para la producción de PUFA, la totalidad de los cuales se utilizan intercambiamente en la presente memoria.

30

Las rutas de PUFA PKS para la síntesis de PUFA en *Shewanella* y otra bacteria marina, *Vibrio marinus*, se describen en detalle en la patente US nº 6.140.486. Las rutas de PUFA PKS para la síntesis de PUFA en el eucariota traustocitridio *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 (en lo sucesivo en la presente memoria, "*Schizochytrium* 20888") se describen en detalle en la patente US nº 6.566.583. Las rutas de PUFA PKS para la síntesis de PUFA en eucariotas, tales como los miembros de los Traustocitriales, incluyendo la descripción adicional de un sistema de PUFA PKS en *Schizochytrium* 20888 y la identificación de un sistema de PUFA PKS en *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892, incluyendo detalles respecto a la utilización de estos sistemas, se describen en detalle en las patentes US nº 7.247.461 y nº 7.642.074, respectivamente. Las rutas de PUFA PKS para la síntesis de PUFA en otro traustocitridio eucariótico, *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695 (en lo sucesivo, "*Schizochytrium* 9695"), se describen en detalle en la solicitud publicada de patente US nº 2010-0266564, publicada el 21 de octubre de 2010, y en la publicación de patente PCT nº WO 2010/108114, publicada el 19 de marzo de 2010. La patente US nº 7.211.418 da a conocer la descripción estructural detallada de un sistema de PUFA PKS en *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892, y detalles adicionales respecto a la producción de ácido eicosapentaenoico (C20:5, n-3) (EPA) y otros PUFA utilizando dichos sistemas. La patente US nº 7.217.856 da a conocer la descripción estructural y funcional de sistemas de PUFA PKS en *Shewanellaolleyana* y *Shewanella japonica*, y usos de dichos sistemas. Estas solicitudes dan a conocer además la modificación genética de organismos con genes que comprenden la ruta de PUFA PKS y la producción de PFA por dichos organismos. Además, la patente US nº 7.776.626 describe un sistema de PUFA PKS en *Ulkenia* y la patente US nº 7.208.590 describe genes y proteínas de PUFA PKS procedentes de *Thraustochytrium aureum*.

45

De acuerdo con lo anterior, las estructuras de dominio básico y características de secuencia de la familia de PUFA sintasa de enzimas han sido descritas, y se ha demostrado que los enzimas PUFA sintasa son capaces de la síntesis *de novo* de diversos PUFA (p.ej., ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-3), ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6, n-3) y ácido docosapentaenoico (DPA-n-6, C22:5, n-6).

60

Las PUFA sintasas producen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *de novo* a partir de malonil-CoA utilizando NADP (y quizá NADH) como poder reductor. Estos enzimas multisubunidad se han identificado tanto en bacterias marinas como en el grupo eucariótico de traustocitridios de algas marinas (Metz et al., Science 293:290-293, 2001). La totalidad de las PUFA sintasas identificadas hasta hoy contienen múltiples dominios ACP en los que se ensamblan los ácidos grasos. Los dominios ACP requieren la unión de un cofactor por una fosfopantetenilo transferasa (PPTasa) para funcionar. Las PPTasas individuales pueden presentar preferencias de sustrato ACP y al expresar una PUFA

65

sintasa en un organismo heterólogo, puede resultar necesario proporcionar una PPTasa que pueda reconocer y activar sus dominios ACP.

5 Se ha conseguido la nueva producción de PUFA en varios organismos huésped heterólogos mediante la expresión de los genes codificantes de las subunidades de la PUFA sintasa junto con una PPTasa apropiada. Resulta de interés particular en la presente memoria la PUFA sintasa derivada de *Schizochytrium* 20888 (Metz et al., Science 293:290-293, 2001). Los productos primarios de esta PUFA sintasa son DHA y DPAn-6. Se ha desarrollado *Schizochytrium* 20888 como fuente comercial de aceite enriquecido en DHA. El organismo puede acumular niveles elevados de aceite (>60% de la biomasa) y DHA puede comprender >40% de los ácidos grasos presentes en esa biomasa (Barclay et al., Single Cell Oils, 2a edición, 2010 AOCS Press, páginas 75 a 96). En el organismo nativo, la proporción de DHA a DPAn-6 típicamente está comprendida entre 2,3 y 2,7. La expresión de las subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888, junto con una PPTasa apropiada (p.ej., Hetl de *Nostoc* sp., ver Hauvermale et al., Lipids 41: 739-747, 2008, y Metz et al., solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599) en células huésped heterólogas ha resultado en la producción de DHA y DPAn-6 en estas células. Aunque se producen DHA y DPAn-6 en células de *E. coli* (Hauvermale et al., Lipids 41:739-747, 2008) y en levaduras y plantas superiores (Metz et al., solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599), los niveles no se aproximan a los observados en el organismo nativo. Además, tanto en levaduras como en plantas, la proporción de DHA a DPAn-6 típicamente es significativamente inferior a la observada en el organismo nativo. Resulta posible que algún factor (o factores) además de las subunidades activadas del enzima mismo se encuentre presente en las células de *Schizochytrium* 20888 que facilite la actividad del enzima.

20 Debido a que factores adicionales implicados en el mecanismo de síntesis de PUFA pueden presentar implicaciones en el incremento de la eficiencia y/o en la mejora de la producción de los PUFA en un organismo que ha sido modificado genéticamente para producir dichos PUFA, existe una necesidad en la técnica de encontrar dicho factor/factores. De acuerdo con lo anterior, también existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados de producción de PUFA, incluyendo en microorganismos que han sido modificados genéticamente para producir dichos PUFA, que aprovechen la actividad de dicho mecanismo.

#### Descripción resumida de la invención

30 Una realización de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que es por lo menos 90% idéntico a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3, en el que el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUFA sintasa.

35 En un aspecto, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico es SEC ID nº 5 o SEC ID nº 7.

40 Otra realización de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que es por lo menos 90% idéntico a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, en la que el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUFA sintasa.

45 En un aspecto, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4. En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico es SEC ID nº 6 o SEC ID nº 8.

50 Todavía otra realización de la invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriormente indicadas, en las que la célula huésped es un microorganismo traustoquitrial o una bacteria.

55 Otra realización de la invención se refiere a un microorganismo modificado genéticamente, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para expresar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriormente indicadas.

60 En otra realización, el microorganismo ha sido modificado genéticamente para expresar una de las moléculas de ácido nucleico recombinante anteriormente indicadas derivadas de SEC ID nº 5 o SEC ID nº 7, y otra molécula de ácido nucleico recombinante derivada de SEC ID nº 6 o SEC ID nº 8.

En una realización, el microorganismo expresa endógenamente un sistema de PUFA sintasa, una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y/o una acil-CoA sintetasa (ACS).

65 En otra realización, el microorganismo ha sido modificado genéticamente para expresar exógenamente un sistema de PUFA sintasa, una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y/o una acil-CoA sintetasa (ACS). En un aspecto, la PUFA

5 sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de un microorganismo traustoquitrial. En un aspecto, la PUFA sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de una PUFA sintasa de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Schizochytrium sp.* American Type Culture Collection (ATCC) n° 20888, *Schizochytrium sp.* American Type Culture Collection (ATCC) n° PTA-9695, *Thraustochytrium 23B* American Type Culture Collection (ATCC) n° 20892, y un mutante de cualquiera de dichos microorganismos. En un aspecto, la PUFA sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de una PUFA sintasa de una bacteria marina.

10 En un aspecto, la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos codificante de la PUFA sintasa del microorganismo genéticamente modificado anteriormente indicado han sido optimizadas para mejorar la expresión de la PUFA sintasa en el microorganismo. En un aspecto, el microorganismo modificado genéticamente comprende por lo menos un ácido graso poliinsaturado (PUFA) seleccionado del grupo que consiste en: DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 or n-3), EPA (C20:5, n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6), y/o SDA (C18:4, n-3). En un aspecto preferente, el microorganismo modificado genéticamente comprende DHA, DPAn-6 y/o EPA.

15 En un aspecto, la cantidad de DHA, DPAn-6 y/o EPA producidos en el microorganismo modificado genéticamente anteriormente indicado es superior a la producida en el microorganismo correspondiente en el que no se expresa ninguna de las moléculas de ácido nucleico anteriormente indicadas.

20 En un aspecto, la proporción DHA:DPAn-6 producida en el microorganismo modificado genéticamente anteriormente indicado es superior a la producida en el microorganismo correspondiente en el que no se expresa ninguna de las moléculas de ácido nucleico recombinante anteriormente indicadas.

Breve descripción de los dibujos de la invención

25 La fig. 1 es un diagrama que muestra el resultado de un ensayo potenciador de la actividad *in vitro* de PUFA sintasa que utiliza las proteínas factores potenciadores Sz-TE2 y Sz-TE3 expresados en *E. coli*.

La fig. 2 es un diagrama que muestra el resultado de un ensayo potenciador de la actividad *in vitro* de PUFA sintasa utilizando extractos de la cepa *Schizochytrium 20888* Quad-KO o extractos de células derivadas de dicha cepa en los que se ha inactivado Sz-TE2 o Sz-TE3.

30 La fig. 3A es un diagrama que muestra la alineación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas factores potenciadores B-TE2 y Sz-TE2.

La fig. 3B es un diagrama que muestra la alineación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas factores potenciadores B-TE3 y Sz-TE3.

35 La fig. 4 es un diagrama que muestra el ensayo potenciador de actividad *in vitro* de PUFA sintasa utilizando B-TE2 y B-TE3 expresados separadamente.

Listado de secuencias

40 Las secuencias de ácido nucleico y secuencias deducidas de traducción en aminoácidos en la lista de secuencias adjunta se muestran utilizando abreviaturas de letras estándares para bases de nucleótidos y aminoácidos, tales como se definen en 37 C.F.R. § 1.822. Sólo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, aunque se entiende que la cadena complementaria se encuentra incluida por referencia a la cadena mostrada. En la lista de secuencias adjunta:

45 SEC ID n° 1 muestra el aminoácido de la proteína TE2 de *Schizochytrium sp.* ATCC-20888 (Sz-TE2):

1 MTAQGGYRSE MLMYYEDTDL TGAVYAGNYF KYFERARDEA  
 VGIDVLKTLMDKEGLALYVR  
 61 KMGEMTFKGG AKHADTLVVE SSVEAPSDFR LVFKQRASVK  
 DRPETIIVET DVEVVCIDMK  
 121 TQRVAKIPTQ IREALRI

SEC ID n° 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína TE3 de *Schizochytrium sp.* ATCC-20888 (Sz-TE3):

ES 2 721 269 T3

1 MAAPSTAVCG ELPKLDEAPL KVSRRARGYDA LDVKVYREDT  
DTVGIVFYRN FLTWFERGRE

61 NAISTDFLAG LFEYSGDSFV VTRSEQSFRK PAFYGDELEV RTIPFADGPF  
RLHFDQSIWR

121 KSDNTLLVAG FVEMVTVSRT FQLTKVPQPV HDLIYYFDDC  
KSNFTYCEKPGAKKRPLRRK

181 PGAPSSLGKT TELDLVIHLA DTDFTGIAFH PNYYCWFERA RSDFLSNEIL  
ARAKTEFHAV

241 PVVRSACLAY KNGARPVEPL RITTTQDPKG EHSDFVVPIL  
QKLTRVSNDQ TLVEAVFEMC

301 FVHDKERHLV KVPSIVRDAI A

SEC ID nº 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína TE2 de *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695 (B-TE2):

5

1 MVMVAEEKRA HEVAVQLYYE DTDFSGFVHH ANFLRYFERG  
RDEMIGLPVL KCLAQDDSSS

61 SSSATSIGGG EPPVSLFVHK VHELSEFKGRA RHGEMLVVRS  
RVVKESDFRL RFAHEAWVGN

121 TLVASGSMDV VFLCGSVDAR LVKIPNSVDV ALHGYY

SEC ID nº 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína TE3 de *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695 (B-TE3):

1 MRIDEEAIRV AAARGYDALP VTVYREFTDC LGIVFYRHYL  
AWFERGRENV ISVQFLADLF

61 RETGESFVVT RSEQVFKRSA RYGDQLEVRT IPFLDGDYRL  
GFDQSVWHGN EMLVHGFVEM

121 VCVSKSFQLA QQPALVRKLI GCFDECTRNF TYVGTKARMP  
QTIRRRRGTA SLPQAQKPLV

181 FDGLHLHQAD TDFTGITFHP NYCYFERAR SQALTPAVLA  
NVAEFANAVP VIRQARMTFK

241 QGARAYETLR VLTSIALDDS GGSSSSSNKY VVPFEQVLVR  
REDDKVLVEA RIEIVFVDQT

10

301 TKLPCPIPDA VAAKMQELFA V

SEC ID nº 5 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE2 de *Schizochytrium* sp. ATC 20888 (SEC ID nº 1):

## ES 2 721 269 T3

1 atgacggcgc agggcggcta cagatcggag atgctcatgt actatgagga cacggacctg  
61 accggagccg tctatcgggg caactacttc aagtactttg agcgcgcgcg cgacgaggct  
121 gtgggcatcg atgtcctcaa gacgctcatg gacaaggagg gcctggcttt gtacgtgcgc  
181 aaaatgggcg agatgacctt taaaggaggc gccaaagcac ccgacacgct cgtcgtcgag  
241 tcctctgtcg aggctccctc ggactttcgc cttgtgttca agcagcgggc atccgtcaag  
301 gaccgtcccg agacgatcat tctcgagacc gatgttgagg tcgtttgcat cgacatgaaa  
361 acgcagcgtg tcgccaagat cccgacgcaa atccgggaag cacttcgtat c

5 SEC ID nº 6 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE3 de *Schizochytrium* sp. ATC 20888 (SEC ID nº 2):

1 atggctgcgc catcgactgc agtctcgggc gagctgcca aagctcgacga ggcgcctctc  
61 aaggtgtctc gtgcacgtgg ctacgacgcg ctcgacgtca aggtgtacag agaggacaca  
121 gacacagtag ggatcgtgtt ctatcgtaac ttttgacct ggtttgagcg tggccgggaa  
181 aacgcgatc ccaagactt tctcgcagga ctgttcgagt acagtgtga ctcttcgtg  
241 gtacgcgggt ccgagcagtc gtttcgcaag cctgcatttt acggcgatga actcgaagtc  
301 cgaaccattc cttttgcaga tgggcccttt cgcctgact ttgaccagag catctggcga  
361 aagagcgaca acacattgct agtcgctggc tttgtagaga tggtcacggt gagcagaact  
421 tttcagtc ccaaggtacc tcagccggtg cacgacctca ttattactt tgacgattgc  
481 aagtcgaact tcactactg cgaaaagccc ggcgccaaga aaaggccgct tcggcgtaag  
541 cccggggcgc cctcttact tggcaaaacc acagagcttg acctggtcat tcacttgcc  
601 gacactgact ttactggaat cgcattccac cccaactact actgittggt cgagcgtgcg  
661 cgctcggatt ttctcagcaa tgagattct gcacgcgcca agaccgatt tcatgctgtt  
721 cccgttgtgc gcagtgcaaa actcgcgtac aaaaacggcg cgaggcctgt tgagccgctc  
781 cgcattacaa cgacgcaaga tccgaagggc gagcactcgg actttgtcgt accgattctt  
841 caaaagctta cgcgtgtctc gaacgaccag acgctcgtcg aagccgtctt tgagatgtgc  
901 tttgtcatg acaaggagcg ccacctcgtc aaggtcccgt cgtcgttcg cgatgctatt  
961 gcg

10 SEC ID nº 7 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE2 de *Schizochytrium* sp. PTA-9695 (SEC ID nº 3):

1 atggtcatgg tcgcgagga gaagagggcg cacgaggtgg cagtacagtt gtactatgag  
61 gacacggact tctccggctt tgtecatcat gccaaactcc tgcgctactt tgaacgcggc  
121 cgggatgaga tgattggcct gcccttctc aatgcttg cccaagacga tagctcttct  
181 tcttctctg caacttcaat tgggtgtggc gagcctccag tatcattgtt cgtgcataag  
241 gtgcacgagt tctcgttcaa aggtcgcgct cggcacgggt agatgctcgt ggtgcgggtca  
301 cgagtgtgca aggaatcggc ctccgactg cgctttgcac acgaagcgtg ggtgggggaa  
361 acgctcgtgg cctctggatc aatggacgtg gtgttcctgt tgggctcgggt cgatgcgcga  
421 ttagtgaaga tccctaactc ggtcgatgtg gccttgcac gatactat

15 SEC ID nº 8 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE3 de *Schizochytrium* sp. PTA-9695 (SEC ID nº 4):

1 atgagaatcg acgaggagcg gatacgcgtg gcagcggcgc gcgggtacga cgccttgccc  
 61 gtgacagtgt atcgagagtt taccgactgc ctgggcattg tgttctaccg gcactaceta  
 121 gcgtggtttg agcgcggggcg cgagaacgtc atctcgggagc agttcttggc ggatctgttt  
 181 cgcgaaacgg gggagtcggt cgtggtgacg cgctccgagc aagtgtttaa gcgctcagcg  
 241 cgctatggcg accaactcga agtgcgcacc atctcttcc tggacggcga ctaccgctc  
 301 ggcttcgacc agagcgtgtg gcacggcaat gagatgctcg tgcattggctt cgtggagatg  
 361 gtctgcgtaa gcaagagctt ccagctggcg caacaaccgg cgctcgtcgc caagctgatc  
 421 ggctgctttg acgagtgcac gcgcaactc acctacgtcg gcaccaaggc ccgcatgccc  
 481 caaaccattc gacgacgagc aggcacggcc agtctaccac aagcacagaa gcctctagt  
 541 ttgacgggc tgcacttga ccaagcggac acagacttca caggtatcac tttcacc  
 601 aactactact gctacttga acgcgcgcg tgcagggcat tgactcccgc cgtattagcg  
 661 aacgtggtg agttcgccaa cgctgtgcca gtcacggcc aagcccgcac gacctcaag  
 721 caaggcgcga gagcgtacga gacactccgc gtgctacat caattgctct ggatgatagc  
 781 ggcggcagca gcagcagcag caacaagtat gtcgtgccgt ttgagcaggt gctcgtgcga  
 841 agagaagacg acaaggtgct ggtggaggcg cgaatcgaga ttgtcttgt ggaccagact  
 901 acgaagttgc cctgcccgat tctgacgca gtggcagcca agatgcagga gttgttgcg  
 961 gta

5 **Descripción detallada de la invención**

Abreviaturas:

ACS	acil-CoA sintetasa
B-TE2 o B_TE2	Proteína factor potenciador 2 de la actividad de PUFA sintasa de <i>Schizochytrium</i> 9695
B-TE3 o B_TE3	Proteína factor potenciador 3 de la actividad de PUFA sintasa de <i>Schizochytrium</i> 9695
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPAn-6	ácido docosapentaenoico n-6
EF-X	Proteínas factores potenciadores de actividad <i>in vitro</i> de PUFA sintasa
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAME	Metil éster de ácido graso
FAS	ácido graso sintasa
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
KO	desactivación génica
LCPUFA	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
PKS	Policétido sintasa
PPTasa	Fosfopantetenil transferasa
PUFA	ácido graso poliinsaturado
Sz-TE2 o SzTE2	Proteína factor potenciador 2 de la actividad de PUFA sintasa de <i>Schizochytrium</i> 20888
Sz-TE3 o SzTE3	Proteína factor potenciador 3 de la actividad de PUFA sintasa de <i>Schizochytrium</i> 20888
<i>Schizochytrium</i> 9695	cepa <i>Schizochytrium</i> sp. ATCC PTA-9695
<i>Schizochytrium</i> 20888	Cepa <i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888

10 En la presente memoria se describen proteínas (generalmente denominadas en la presente memoria “proteínas factores potenciadores de la actividad *in vitro* de PUFA sintasa” o “EF-X”) y moléculas de ácido nucleico codificantes de dichas proteínas, para la mejora de la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y particularmente PUFA de cadena larga (LCPUFA), en un organismo huésped que ha sido modificado genéticamente para producir dichos PUFA. En la presente memoria se describen además organismos que han sido modificados genéticamente para  
 15

expresar algunas determinadas de dichas proteínas, y a métodos de preparación y utilización de dichas proteínas y organismos. La presente invención se refiere a dichas moléculas de ácido nucleico codificantes de dichas proteínas y a dichos organismos que han sido modificados genéticamente para expresar algunas determinadas de dichas proteínas.

5 Según la presente invención, un organismo que ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa, en el que el organismo no expresa naturalmente (endógenamente, sin modificación genética) dicho sistema, puede denominarse en la presente memoria organismo huésped "heterólogo" con respecto a la modificación del organismo con el sistema de PUFA sintasa. Las modificaciones genéticas de la presente invención pueden utilizarse además para mejorar la producción de PUFA en un organismo huésped que expresa endógenamente un sistema de PUFA sintasa, en el que el organismo no se modifica adicionalmente con un sistema diferente de PUFA sintasa o una parte del mismo, sino que se modifica genéticamente para expresar las proteínas factores potenciadores indicados en la presente memoria.

15 Más particularmente, los presentes inventores han encontrado y dan a conocer por primera vez una clase de proteínas factores potenciadores que potencian la actividad de las PUFA sintasas. Los presentes inventores han determinado que un productor endógeno de PUFA por el sistema de PUFA sintasa, es decir, *Schizochytrium* 20888, posee una o más proteínas factores potenciadores que pueden ser capaces de potenciar la producción de los PUFA. Lo anterior resulta evidente por el hecho de que la expresión de estos factores, especialmente la coexpresión de las dos proteínas factores potenciadores en organismos huésped heterólogos que también expresan un sistema de PUFA sintasa activo de *Schizochytrium* 20888 resulta en una acumulación incrementada de los PUFA y en una proporción DHA:DPAn-6 incrementada en las células de dichos organismos. La disrupción de los genes endógenos codificantes de estas proteínas en *Schizochytrium* 20888 conduce a una reducción de la acumulación de los PUFA en dichas células.

25 Los presentes inventores han identificado dos proteínas factores potenciadores de *Schizochytrium* 20888: SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2. No son parte del sistema de PUFA sintasa mismo, aunque se encuentra que potencian la actividad *in vitro* de las PUFA sintasas. Ambas proteínas factores potenciadoras presentan homología respecto a una clase de tioesterasas denominadas tioesterasas de tipo 4-hidroxi-benzoil-CoA. Sin embargo, las proteínas factores potenciadoras pueden presentar o no presentar actividad de tioesterasa. La SEC ID nº 1 (denominada en la presente memoria proteína factor potenciador 2 de *Schizochytrium* 20888 o proteína Sz-TE2) presenta un dominio de tioesterasa, mientras que SEC ID Nº 2 (denominada en la presente memoria proteína factor potenciador 3 de *Schizochytrium* 20888 o proteína Sz-TE3) presenta dos dominios de tioesterasa. La proteína Sz-TE2 y la proteína Sz-TE3 funcionan más eficientemente al expresarse juntas. Ver, por ejemplo, el Ejemplo 4.

35 También se han identificado homólogos de dichas dos proteínas en otro traustozófito: cepa *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695 que se denomina en la presente memoria '*Schizochytrium* 9695'. La SEC ID nº 3 se denomina en la presente memoria proteína factor potenciador 2 de *Schizochytrium* 9695 (en la presente memoria se denomina proteína B-TE2). La SEC ID nº 4 se denomina en la presente memoria proteína factor potenciador 3 de *Schizochytrium* 9695 (en la presente memoria se denomina proteína B-TE3). En la presente memoria se demuestra que estos homólogos presentan actividad potenciadora *in vitro* de PUFA sintasa que es similar a las proteínas homologas de *Schizochytrium* 20888. Ver, por ejemplo, los Ejemplos 9 y 10.

45 Sz-TE2 y B-TE2 se denominan en la presente memoria en general como proteínas factores potenciadoras TE2. Sz-TE3 y B-TE3 se denominan en la presente memoria en general como proteínas factores potenciadoras TE3. Se ha encontrado en la presente invención que TE2, TE3 y en particular la combinación de TE2 y TE3 potencian la actividad enzimática de PUFA sintasa en una célula huésped en la que se expresan exógenamente TE2 y TE3.

50 Las tioesterasas son una clase de enzimas que ha sido ampliamente estudiada en el pasado. Un polipéptido o un dominio de polipéptido con actividad de tioesterasa se ha demostrado anteriormente que es capaz de catalizar la hidrólisis del enlace tioéster de los ácidos grasos unidos a proteínas portadoras de CoA o acilo. Los elementos de los enzimas tioesterasas se han clasificado en familias según estructura primaria y en clanes y superfamilias según la estructura terciaria (ver Cantu et al., Protein Science 19:1281-1295, 2010). Se encuentran disponibles más de ochenta estructuras cristalinas de las tioesterasas o sus dominios, que proporcionan una gran cantidad de información sobre las estructuras terciarias, residuos catalíticos y mecanismos de los enzimas. *ibid.* Algunas tioesterasas presentan la característica de un pliegue 'hot dog' (ver Pidugu et al., 2009, BMC Structural Biology, 9:37 pp1-16). El pliegue hotdog fue identificado por primera vez en la estructura cristalina de la  $\beta$ -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa (Fab A) de *E. coli* (ver Leesong et al., Structure 4(3):253-264, 1996). Según Leesong et al., se han identificado por lo menos ocho tipos de tioesterasas de pliegue hotdog y se han puesto a disposición sus estructuras cristalinas, incluyendo la 4-hidroxi-benzoil-CoA tioesterasa. Entre las subfamilias de tioesterasa, la subfamilia de 4-hidroxi-benzoil-CoA tioesterasas comparte la homología más grande de las secuencias de proteína con las proteínas TE2 y TE3 identificadas en la presente invención.

65 Los presentes inventores creen que las proteínas factores potenciadores encontradas por los presentes inventores resultan útiles para modificar la acumulación de PUFA en los huéspedes que expresan una PUFA sintasa, es decir, incrementar o reducir la cantidad acumulada de PUFA y/o modificar la proporción de los productos PUFA. En efecto, los Ejemplos presentados en la presente memoria demuestran que las proteínas factores potenciadores de

*Schizochytrium* 20888 incrementan la acumulación de los PUFA en aquellas cepas de *E. coli* y de levadura que han sido modificadas genéticamente con un sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888. Además, las proteínas factores potenciadores alteran la proporción de productos PUFA del sistema de PUFA sintasa. Cada una de estas proteínas factores potenciadores y los ácidos nucleicos codificantes de los mismos se encuentran comprendidos en la presente invención, así como los homólogos y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Estas proteínas y moléculas de ácido nucleico se comentan en detalle posteriormente y en los Ejemplos.

En la presente memoria se describen proteínas factores potenciadores aislados que potencian la cantidad y alteran la proporción de productos de un sistema de PUFA sintasa. En la presente memoria se describe una o más proteínas factores potenciadores aislados que se derivan de un organismo que expresa endógenamente un sistema de PUFA sintasa. Entre dichos organismos se incluyen, aunque sin limitación, miembros de los traustoquitriales. En la presente memoria se describen las proteínas aisladas derivadas del género *Schizochytrium*. En la presente memoria se describe una proteína factor potenciador aislado que se deriva de *Schizochytrium* 20888 o de *Schizochytrium* 9695. Tal como se describe en la presente memoria, cualquier proteína que es un homólogo de las proteínas factores potenciadores identificadas en la presente invención y que funciona junto con cualquier sistema de PUFA sintasa en la modificación de la producción y/o acumulación de los PUFA en una célula u organismo huésped puede utilizarse en la presente invención.

Tal como se describe en la presente memoria, la proteína factor potenciador aislado está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID nº 5, 6, 7 o 8. Tal como se describe en la presente memoria, la proteína factor potenciador aislado está codificado por una secuencia de ácido nucleico degenerada codificante de una proteína que está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID nº 5, 6, 7 o 8. SEC ID nº 5 es la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE2 de *Schizochytrium* 20888. SEC ID nº 6 es la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE3 de *Schizochytrium* 20888. SEC ID nº 7 es la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE2 de *Schizochytrium* 9695. SEC ID nº 8 es la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína TE3 de *Schizochytrium* 9695.

Tal como se describe en la presente memoria, la proteína factor potenciador aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o un homólogo de cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos, incluyendo cualesquiera fragmentos o dominios biológicamente activos de dichas secuencias.

Tal como se describe en la presente memoria, una proteína factor potenciador de la presente descripción incluye, por ejemplo y sin limitación, por lo menos una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 50% (p.ej., de por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%) respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3.

Tal como se describe en la presente memoria, una proteína factor potenciador incluye, por ejemplo y sin limitación, por lo menos una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 50% (p.ej., de por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%) respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

Una realización de la invención se refiere a una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 90% (p.ej., de por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%) respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3, en el que el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUF sintasa. En un aspecto, la molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. En un aspecto, la molécula aislada de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es SEC ID nº 5 o SEC ID nº 7.

Una realización de la invención se refiere a una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 90% (p.ej., de por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%) respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4. En un aspecto, el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUFA sintasa. En un aspecto, la molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, en la que la molécula aislada de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que es la SEC ID nº 6 o SEC ID nº 8.

La invención incluye la expresión de una o más proteínas factores potenciadores tal como se describen y ejemplifican en la presente memoria con un sistema de PUFA sintasa tal como se describe en la presente memoria y con una PPTasa y/o acil-CoA sintetasa (ACS) exógenas para incrementar la producción y/o acumulación de PUFA en un huésped heterólogo.

#### Sistemas de PUFA sintasa (sistemas de PUFA PKS).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a proteínas factores potenciadores para la utilización en relación a un sistema de PUFA sintasa. Tal como se utiliza en la presente memoria, un sistema de PUFA sintasa (que también puede denominarse sistema de PUFA PKS, sistema de PUFA sintasa de tipo PKS, PUFA sintasa o enzima PUFA sintasa) generalmente presenta las características identificativas siguientes: (1) produce PUFA y particularmente PUFA de cadena ligera, como producto natural del sistema, y (2) produce aquellos PUFA *de novo* utilizando malonil-CoA como fuente de carbono. Además, los dominios de ACP presentes en los enzimas de PUFA sintasa requieren la activación mediante unión de un cofactor (4-fosfopanteteína). La unión de dicho factor se lleva a cabo mediante fosfopanteteinil transferasas (PPTasa). En el caso de que las PPTasas endógenas del organismo huésped sean incapaces de activar los dominios ACP de la PUFA sintasa, resulta necesario proporcionar una PPTasa que sea capaz de llevar a cabo esa función. El enzima HetI de *Nostoc* sp. es una PPTasa ejemplar y adecuada para activar los dominios ACP de la PUFA sintasa. La referencia a un sistema de PUFA sintasa se refiere colectivamente a todos los genes y a sus productos codificados que funcionan juntos para producir los PUFA en un organismo.

Más específicamente, un sistema de PUFA sintasa tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria produce ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y en particular PUFA de cadena larga (LCPUFA) como productos. Por ejemplo, un organismo que contiene endógenamente (naturalmente) un sistema de PUFA sintasa produce PUFA utilizando este sistema. Según la presente invención, los PUFA son ácidos grasos con una longitud de cadena de carbonos de por lo menos 16 carbonos, y más preferentemente por lo menos 18 carbonos, y más preferentemente por lo menos 20 carbonos, y más preferentemente 22 o más carbonos, con por lo menos 3 o más dobles enlaces, y preferentemente 4 o más, y más preferentemente 5 o más, y todavía más preferentemente 6 o más dobles enlaces, en el que todos los dobles enlaces se encuentran en la configuración *cis*. La referencia a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) en la presente memoria se refiere más particularmente a ácidos grasos de 18 o más carbonos de longitud de cadena y preferentemente de 20 y más carbonos de longitud de cadena, que contiene 3 o más dobles enlaces. Los LCPUFA de la serie omega-6 incluyen: ácido gamma-linolénico (C18:3), ácido di-homo-gamma-linolénico (C20:3 n-6), ácido araquidónico (C20:4 n-6), ácido adrenico (también denominado ácido docosatetraenoico o DTA) (C22:4 n-6) y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6). Los LCPUFA de la serie omega-3 incluyen: ácido alfa-linolénico (C18:3), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3). Los LCPUFA incluyen además ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más dobles enlaces, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los C28:8 n-3.

Las proteínas factores potenciadores según la presente invención pueden utilizarse en relación a un sistema de PUFA sintasa procedente de un organismo procariontico o de un organismo eucariótico. Puede encontrarse una descripción de los sistemas de PUFA sintasa de diversos organismos en, por ejemplo, las patentes US nº 6.140.486, nº 6.566.583; Metz et al., Science 293:290-293, 2001; patentes US nº 7.247.461, nº 7.211.418, nº 7.217.856, solicitud publicada de patente US nº 2010-0266564 y publicación de patente PCT nº WO 2006/135866.

La arquitectura de dominios de diversos sistemas de PUFA sintasa de bacterias marinas y de miembros de *Thraustochytrium*, y las características estructurales y funcionales de genes y proteínas que comprenden tales sistemas de PUFA sintasa se han descrito en detalle (ver, p.ej., las patentes US nº 6.140.486 y nº 6.566.583; Metz et al., Science 293:290-293, 2001; las patentes US nº 7.247.461, nº 7.211.418, nº 7.217.856, la solicitud publicada de patente US nº 2010-0266564 y la publicación de patente PCT nº WO 2006/135866).

La actividad enzimática de una PUFA sintasa puede medirse en forma de tasa de acumulación de PUFA y de perfil de composición de PUFA. Se describen dos métodos ejemplares de medición de la actividad de PUFA sintasa en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. En esos ensayos, se utiliza malonil-CoA marcada radioactivamente como sustrato y es convertida en PUFA por el sistema de PUFA sintasa. Se mide la cantidad y las composiciones de los PUFA producidos.

#### Fosfopanteteinil transferasa (PPTasa)

Tal como se ha comentado anteriormente, bajo las directrices generales para la producción de PUFA en un huésped heterólogo, con el fin de producir PUFA, un sistema de PUFA sintasa debe funcionar con una proteína accesoria que transfiera una fracción 4'-fosfopanteteinilo desde el coenzima A hasta el dominio o dominios de la proteína portadora de acilo (ACP). Por lo tanto, puede considerarse que un sistema de PUFA sintasa incluye por lo menos un dominio de 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) o puede considerarse que dicho dominio es un dominio o proteína accesoria para el sistema de PUFA sintasa. Las características estructurales y funcionales de las PPTasas han sido descritas en detalle en, por ejemplo, las patentes US nº 7.247.461, nº 7.211.418 y nº 7.217.856.

Según la presente invención, un dominio o proteína con actividad (función) biológica de 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) se caracteriza como el enzima que transfiere una fracción 4'-fosfopanteteinilo desde el coenzima A hasta la proteína portadora de acilo (ACP). Esta transferencia a un residuo de serina invariante de la ACP activa la forma apo inactiva en la forma holo. En la síntesis tanto de policétido como de ácido graso, el grupo fosfopanteteína forma tioésteres con las cadenas acilo en crecimiento. Las PPTasas son una familia de enzimas que han sido bien caracterizados en la síntesis de ácidos grasos, en la síntesis de policétidos y en la síntesis no ribosómica de péptidos. Las secuencias de muchas PPTasas son conocidas y se han determinado las estructuras cristalinas (p.ej., Reuter et al., EMBO J. 18(23):6823-6831, 1999), así como el análisis mutacional de los residuos aminoácidos importantes para la actividad (Mofid et al., Biochemistry 43(14):4128-4136, 2004).

De acuerdo con lo anterior, una realización de la invención se refiere a una célula o microorganismo huésped modificado genéticamente, en el que la célula o microorganismo huésped ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema nuclear de PUFA sintasa tal como se ha descrito en la presente memoria y también una PPTasa tal como se describe en la presente memoria. Las PPTasas adecuadas se han descrito anteriormente y también se encuentran descritas en la técnica. La PPTasa puede expresarse en el mismo constructo o en un constructo diferente en forma de una o más moléculas de ácido nucleico codificantes de la proteína o proteínas nucleares de PUFA sintasa. En un aspecto, la PPTasa es HetI de *Nostoc*.

#### Acil-CoA sintetetasas

Las proteínas de acil-CoA sintetasa (ACS) catalizan la conversión de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés), incluyendo los PUFA de cadena larga, en acil-CoA. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de polipéptidos con actividad de ACS y pueden utilizarse en realizaciones en la presente memoria. Por ejemplo, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 posee una o más ACS que son capaces de convertir los productos ácido graso libre de su PUFA sintasa en acil-CoA. Ver, p. ej., la patente US n° 7.759.548.

La proteína ACS puede obtenerse a partir de un organismo que expresa endógenamente un sistema de PUFA sintasa. Entre dichos organismos se incluye, aunque sin limitación, un traustokitridio. En un aspecto, la ACS aislada se obtiene a partir de organismos de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Ulkenia*. En otro aspecto, la ACS aislada se obtiene a partir de *Schizochytrium* ATCC 20888. En otro aspecto, cualquier ACS que funcione junto con cualquier sistema de PUFA sintasa para incrementar la producción y/o acumulación de PUFA en una célula u organismo huésped puede ser utilizada en la presente invención.

#### Células y organismos modificados genéticamente

Con el fin de producir rendimientos significativamente elevados de uno o más ácidos grasos poliinsaturados deseados u otras moléculas bioactivas, un organismo, preferentemente un microorganismo, puede modificarse genéticamente para alterar la actividad, y en particular el producto o productos finales, del sistema de PUFA sintasa en el microorganismo, o para introducir un sistema de PUFA sintasa en el microorganismo. En la presente memoria se describen métodos para mejorar o potenciar la eficacia de dicha modificación genética y en particular para mejorar o potenciar la producción y/o acumulación del producto final de un sistema de PUFA sintasa, preferentemente uno o más PUFA.

Por lo tanto, una realización de la presente invención se refiere a un organismo modificado genéticamente, en el que el organismo expresa un sistema de PUFA sintasa, y en el que el organismo ha sido modificado genéticamente para expresar la proteína o proteínas factores potenciadores tal como se describen en la presente memoria, para la mejora de la producción y/o acumulación de PUFA (u otros productos bioactivos del sistema de PUFA sintasa) por parte del huésped. En el caso de que el sistema de PUFA sintasa sea heterólogo respecto al huésped, el organismo preferentemente también se modifica genéticamente para expresar una PPTasa como proteína accesoria de una PUFA sintasa, que se ha descrito en detalle anteriormente. En algunas realizaciones, el organismo ha sido modificado genéticamente para expresar una o más proteínas factores potenciadores indicados en la presente memoria, y preferentemente una combinación de proteínas TE2 y TE3 o sus homólogos.

En una realización, en el caso de que el sistema de PUFA sintasa sea endógeno al huésped, el organismo puede modificarse genéticamente para expresar una o más proteínas factores potenciadores heterólogos tal como se han indicado anteriormente, que mejoran la producción y/o acumulación de PUFA (u otro producto bioactivo del sistema de PUFA sintasa) en el organismo huésped.

En otra realización, los organismos huésped pueden modificarse genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa heterólogo. El sistema de PUFA sintasa expresado por el organismo puede incluir cualquier sistema de PUFA sintasa, por ejemplo los sistemas de PUFA PKS que se obtienen completamente a partir de un sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888, así como los sistemas de PUFA sintasa que se producen mediante "mezcla y correspondencia" de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de proteínas y/o dominios de diferentes sistemas de PUFA sintasa (p.ej., mediante la mezcla de proteínas y/o dominios de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 con proteínas y/o dominios de PUFA sintasa de, p.ej., *Schizochytrium* 9695, o los derivados de los géneros

*Thraustochytrium, Ulkenia, Shewanella, Moritella* y/o *Photobacterium*, etc.) y/o de diferentes sistemas no PUFA sintasa (p.ej., sistemas de PKS de tipo I modular, tipo I iterativo, tipo II o tipo III), en los que las proteínas y/o dominios de diferentes organismos se combinan para formar un sistema de PUFA sintasa funcional completo. Los sistemas de PUFA sintasa, incluyendo la combinación de genes o proteínas de PUFA sintasa de diferentes organismos, se describen en detalle en las patentes US nº 6.140.486 y nº 6.566.583; Metz et al., Science 293:290-293; patentes US nº 7.247.461, nº 7.211.418 y nº 7.217.856; solicitud publicada de patente US nº 2010-0266564 y publicación de patente PCT nº WO 20067135866, *supra*). Los genes y proteínas de PUFA sintasa también se dan a conocer en: las patentes US nº 7.939.305 y nº 7.208.590.

De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se describen métodos para modificar genéticamente organismos, mediante: la expresión de una o más proteínas factores potenciadores exógenos indicados en la presente memoria, especialmente una combinación de proteínas factores potenciadores TE2 y TE3, y/o mediante la modificación genética de por lo menos una secuencia de ácido nucleico en el organismo que codifica por lo menos un dominio o proteína funcional (o fragmento u homólogo biológicamente activo del mismo) o un sistema de PUFA sintasa, incluyendo, aunque sin limitación, cualquier sistema de PUFA sintasa específicamente descrito en la presente memoria. Tal como se indica en la presente memoria, puede optimizarse cualquiera de las secuencias de ácido nucleico introducidas exógenamente para el uso de codones o la expresión mejorada en el huésped. Tal como se indica en la presente memoria, puede dirigirse cualquiera de las secuencias de ácido nucleico introducidas a uno o más orgánulos en el organismo. Se han descrito en detalle anteriormente diversas realizaciones de dichas secuencias, métodos para modificar genéticamente un organismo, modificaciones específicas y combinaciones de los mismos, y se encuentran comprendidas en la presente invención. Típicamente, el método se utiliza para producir un organismo modificado genéticamente particular que produce una o más moléculas bioactivas particulares.

Los organismos modificados genéticamente de la invención son microorganismos modificados genéticamente.

Preferentemente, un organismo modificado genéticamente de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo, aunque sin limitación, DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), EPA (C20:5, n-3), ARA (C20:4, n-6), GLA (C18:3, n-6), ALA (C18:3, n-3) y/o SDA (C18:4, n-3)), y más preferentemente, uno o más PUFA de cadena más larga, incluyendo, aunque sin limitación, DHA (C22:6, n-3), DPA (C22:5, n-6 o n-3), EPA (C20:5, n-3), o DTA (C22:4, n-6), o cualquier combinación de los mismos. En una realización particularmente preferente, un microorganismo modificado genéticamente de la invención produce uno o más ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo, aunque sin limitación, DHA (C22:6 n-3) y DPA (C22:5 n-6 o n-3) o cualquier combinación de los mismos.

Según la presente invención, un organismo modificado genéticamente incluye un organismo que ha sido modificado utilizando tecnología recombinante o mediante técnicas clásicas de mutagénesis y cribado. Tal como se utiliza en la presente memoria, las modificaciones genéticas que resultan en una reducción de la expresión génica, en la función del gen, o en la función del producto génico (es decir, la proteína codificada por el gen) puede denominarse inactivación (completa o parcial), delección, interrupción, bloqueo o regulación negativa de un gen. Por ejemplo, una modificación genética en un gen que resulta en una reducción de la función de la proteína codificada por dicho gen puede resultar en una delección completa del gen (es decir, el gen no existe y, por lo tanto, la proteína no existe), una mutación en el gen que resulta en una traducción incompleta o nula de la proteína (p.ej., la proteína no se expresa) o una mutación en el gen que reduce o anula la función natural de la proteína (p.ej., se expresa una proteína que presenta una actividad o acción enzimática reducida o nula). Puede hacerse referencia a las modificaciones genéticas que resultan en un incremento de la expresión o función génica como amplificación, sobreproducción, sobreexpresión, activación, potenciación, adición o regulación positiva de un gen.

#### Microorganismos modificados genéticamente

Tal como se utiliza en la presente memoria, un microorganismo modificado genéticamente puede incluir una bacteria o microorganismo traustochytrial modificado genéticamente. Dicho microorganismo modificado genéticamente presenta un genoma que ha sido modificado (es decir, mutado o cambiado) respecto a su forma normal (es decir, de tipo salvaje o natural), de manera que se consigue el resultado deseado (es decir, una actividad y/o producción de PUFA sintasa incrementada o modificada y la acumulación de un producto deseado utilizando el sistema de PUFA PKS). La modificación genética de un microorganismo puede llevarse a cabo utilizando técnicas clásicas de desarrollo de cepas y/o de genética molecular. Dichas técnicas conocidas se dan a conocer de manera general para microorganismos en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un microorganismo modificado genéticamente puede incluir un microorganismo en el que se han insertado, delecionado o modificado moléculas de ácidos nucleicos (es decir, se han mutado, p.ej., mediante inserción, delección, sustitución y/o inversión de nucleótidos), de manera que tales modificaciones proporcionen el efecto deseado dentro del microorganismo.

Entre los ejemplos de microorganismos huésped adecuados para la modificación genética se incluyen células bacterianas. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, *Escherichia coli*, que pueden resultar útiles en procedimientos de fermentación. Alternativamente, y sólo a título de ejemplo, puede utilizarse un huésped tal como una especie de *Lactobacillus* o especie de *Bacillus* como huésped.

Entre otros huéspedes para la utilización en la presente invención se incluyen microorganismos de uno de los géneros, aunque sin limitación, siguientes: *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, *Elina* y *Schizochytrium* dentro de las traustochytriales. Entre las especies preferentes dentro de estos géneros se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cualquiera de las especies indicadas posteriormente. Entre las cepas particularmente preferentes de traustochytriales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas: *Schizochytrium* sp. (S31)(ATCC 20888); *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-9695); *Schizochytrium* sp. (S8)(ATCC 20889); *Schizochytrium* sp. (LC-RM)(ATCC 18915), *Schizochytrium* sp. (SR21); *Schizochytrium* sp. N230D, *Schizochytrium aggregatum* (Goldstein et Belsky)(ATCC 28209), *Schizochytrium limacinum* (Honda et Yokochi)(IFO 32693), *Thraustochytrium* sp. (23B)(ATCC 20891 o ATCC 20892), *Thraustochytrium striatum* (Schneider)(ATCC 24473), *Thraustochytrium aureum* (Goldstein)(ATCC 34304), *Thraustochytrium roseum* (Goldstein)(ATCC 28210) y *Japonochytrium* sp. (L1)(ATCC 28207).

En una realización de la presente invención, las proteínas factores potenciadores de PUFA sintasa (p.ej., TE2 y TE3) de un microorganismo se introducen exógenamente en un microorganismo huésped que presenta un sistema de PUFA sintasa exógeno a fin de incrementar la cantidad de PUFA producidos. En otra realización, las proteínas factores potenciadores exógenos y un sistema de PUFA sintasa exógeno de un microorganismo se introducen en un microorganismo huésped que no presenta ningún sistema de PUFA sintasa a fin de producir una cantidad detectable de PUFA. Entre los ejemplos de secuencias heterólogas que podrían introducirse en un genoma huésped se incluyen secuencias codificantes de por lo menos un dominio o proteína de PUFA sintasa funcional de otra PKS sintasa o incluso un sistema entero de PUFA sintasa (p.ej., todos los genes asociados al sistema de PUFA sintasa). Una secuencia heteróloga puede incluir además una secuencia codificante de un dominio funcional modificado (un homólogo) de un dominio natural de un sistema de PUFA sintasa. Entre otras secuencias heterólogas que pueden introducirse en el genoma del huésped se incluyen PPTasa y/o ACS.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente descripción producida, mediante la manipulación genética de microorganismos tal como se indica en la presente memoria, PUFA y, por extensión, aceites obtenidos de dichos microorganismos que comprenden estos PUFA. Entre los ejemplos de PUFA que pueden producirse mediante el presente método se incluyen, aunque sin limitación, DHA (ácido docosaheptaenoico (C22:6 n-3)), DPA (ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6 o n-3)) y EPA (ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3)) y cualesquiera combinaciones de los mismos. La presente descripción permite la producción de lípidos comercialmente valiosos enriquecidos en uno o más PUFA (primarios) deseados mediante el desarrollo por los presentes inventores de microorganismos modificados genéticamente mediante la utilización del sistema de PUFA sintasa que produce los PUFA.

Durante la utilización de un sistema de PUFA sintasa tal como se indica en la presente memoria, un sistema de PUFA sintasa dado derivado de un organismo particular producirá uno o más PUFA particulares, de manera que la selección de un sistema de PUFA sintasa a partir de un organismo particular resultará en la producción de PUFA específicos. Por ejemplo, la utilización de un sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 resultará en la producción de DHA y DPAn-6 como PUFA primarios.

*Schizochytrium* 20888 puede acumular niveles elevados de aceite (>60% de la biomasa) y DHA puede comprender >40% de los ácidos grasos presentes en esa biomasa. En el organismo nativo, la proporción de DHA a DPAn-6 típicamente está comprendida entre 2,3 y 2,7. La expresión de las subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 junto con una PPTasa apropiada (p.ej., HetI de *Nostoc* sp.) en células huésped heterólogas ha resultado en la producción de DHA y DPAn-6 en dichas células. Aunque se produce DHA y DPAn-6 en las células de *E. coli* y en levaduras y plantas superiores, los niveles no se aproximan a los observados en el organismo nativo. Además, tanto en levaduras como en plantas, la proporción de DHA a DPAn-6 típicamente es significativamente inferior a la observada en el organismo nativo.

Tal como se indica en la presente memoria, un microorganismo puede modificarse genéticamente para introducir uno o más genes codificantes de las proteínas factores potenciadores descritos en la presente memoria, a fin de incrementar la producción de PUFA a partir de la PUFA sintasa particular presente en ese organismo (p.ej., DHA, DPAn-6 y/o EPA). Además, la introducción de las proteínas factores potenciadores indicados en la presente memoria puede resultar en una alteración de las cantidades relativas de los PUFA producidos por la PUFA sintasa particular presente en ese organismo (p.ej., puede incrementarse la proporción de DHA a DPAn-6 producida en el microorganismo).

Por lo tanto, una realización de la presente invención se refiere a un microorganismo modificado genéticamente (p.ej., en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa descrito en la presente memoria), que incluye la PUFA sintasa nuclear, una PPTasa y/o una ACS tal como se describe en la presente memoria, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente adicionalmente para expresar una o más proteínas factores potenciadores tal como se describe en la presente memoria, para la mejora de la producción y/o acumulación de PUFA (u otros productos bioactivos del sistema de la PUFA sintasa) por parte del huésped. Preferentemente, dicha proteína factor potenciador es una combinación de las proteínas TE2 y TE3. Las proteínas factores potenciadores indicados en la presente memoria, tales como TE2 y TE3, incluyen homólogos y fragmentos biológicamente activos de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, el microorganismo modificado genéticamente que ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa heterólogo y una combinación de las proteínas TE2 y TE3, presenta un nivel incrementado de acumulación de PUFA totales respecto al microorganismo sin expresión de proteínas TE2 y TE3. En una realización, la acumulación de PUFA total se encuentra incrementada en más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces, más de 9 veces o más de 10 veces. En una realización, el nivel incrementado de acumulación de PUFA total es próxima o igual al nivel producido por el microorganismo nativo del sistema de PUFA sintasa heterólogo. En una realización, el nivel incrementado de acumulación total de PUFA es de entre 90% y 110% de la cantidad de PUFA producida por el microorganismo nativo del sistema de PUFA sintasa heterólogo.

En algunas realizaciones, el microorganismo modificado genéticamente que ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa heterólogo y una combinación de las proteínas TE2 y TE3, presenta un nivel incrementado de acumulación total de DHA, DPA(n-6) y EPA en comparación con el microorganismo sin expresión de proteínas TE2 y TE3. En una realización, el nivel de acumulación de DHA y DPAn-6 se encuentra incrementado en más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces, más de 9 veces o más de 10 veces. En una realización, el nivel incrementado de acumulación de DHA y DPAn-6 es próxima o igual al nivel producido por el microorganismo nativo del sistema de PUFA sintasa heterólogo. En una realización, el nivel incrementado de acumulación de DHA y DPAn-6 de entre 90% y 110% de la cantidad de PUFA producida por el microorganismo nativo del sistema de PUFA sintasa heterólogo.

En algunas realizaciones, el microorganismo modificado genéticamente que ha sido modificado genéticamente para expresar un sistema de PUFA sintasa heterólogo y una combinación de proteínas TE2 y TE3 presenta una proporción potenciada de DHA:DPAn-6 en peso de ácidos grasos totales respecto al microorganismo sin dicha modificación genética. En una realización, la proporción más elevada de DHA:DPAn-6 es próxima o igual a la proporción en el microorganismo del que se obtiene el sistema de PUFA sintasa. En una realización, la proporción DHA:DPAn-6 potenciada es de entre 90% y 110% de la proporción DHA:DPAn-6 del microorganismo del que se obtiene el sistema de PUFA sintasa.

Tal como se indica en la presente memoria, la modificación genética de un microorganismo según la presente descripción puede realizarse para afectar positivamente a la actividad del sistema de PUFA sintasa expresado por el microorganismo, o para afectar negativamente a la actividad del sistema de PUFA sintasa expresado por el microorganismo. Por ejemplo, la actividad del sistema de PUFA sintasa puede reducirse o incluso bloquearse mediante una reducción o eliminación de la expresión de las proteínas factores potenciadores endógenos del microorganismo huésped. Tal como se indica en la presente memoria, el microorganismo huésped es un microorganismo traustozoitario. Tal como se indica en la presente memoria, el microorganismo huésped es un *Schizochytrium* 20888. En otra realización, el microorganismo huésped es un *Schizochytrium* 9695.

#### Usos para organismos modificados genéticamente de la invención

En la presente memoria se describe un método para producir moléculas bioactivas (también denominadas productos o compuestos) deseadas mediante el cultivo de un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención (descrito en detalle anteriormente). Preferentemente, la molécula bioactiva es un PUFA, y más preferentemente, un LCPUFA. Preferentemente, el microorganismo modificado genéticamente es un microorganismo modificado genéticamente. Dicho método incluye, por ejemplo, la etapa de cultivo en un medio de fermentación de un microorganismo tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria y según la presente invención. Las células huésped y microorganismos preferentes para la modificación genética relacionados con el sistema de PUFA sintasa de la invención se han indicado anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para producir PUFA mediante el cultivo de un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención (descrito en detalle anteriormente). Dicho método incluye la etapa de cultivo en un medio de fermentación y bajo condiciones eficaces para producir el PUFA o los PUFA, de un microorganismo que presenta una modificación genética tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria y según la presente invención. Un medio apropiado, o eficaz, se refiere a cualquier medio en el que un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención, bajo cultivo, es capaz de producir el producto o productos PUFA deseados. Dicho método es típicamente un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato. Dicho medio puede incluir además sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados. Cualesquiera microorganismos de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales. Los microorganismos pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento de fermentación que incluye, aunque sin limitación, la fermentación por lotes, alimentado por lotes, con reciclado celular y continua. Las condiciones de crecimiento preferentes para los microorganismos traustozoitarios según la presente invención son bien conocidas en la técnica y se describen en detalle en, por ejemplo, las patentes US nº 5.130.242, nº 5.340.742 y nº 5.698.244.

El PUFA o los PUFA y/o otras moléculas bioactivas deseadas producidas por el microorganismo modificado genéticamente pueden recuperarse del medio de fermentación utilizando técnicas convencionales de separación y

purificación. Por ejemplo, el medio de fermentación puede filtrarse o centrifugarse para eliminar microorganismos, residuos celulares y otras materias particuladas, y el producto puede recuperarse a partir del sobrenadante sin células mediante métodos convencionales, tales como, por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía, extracción, extracción con solvente, separación de fases, separación mediante membrana, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, derivatización química y cristalización. Alternativamente, pueden utilizarse microorganismos que produzcan el PUFA o los PUFA, o extractos y diversas fracciones de los mismos, sin eliminación de los componentes microorganismos respecto del producto.

En la presente memoria se describe un método para modificar un producto que contiene por lo menos un ácido graso, que comprende añadir al producto, un microorganismo o aceite producido por un microorganismo modificado genéticamente según la invención y tal como se indica en la presente memoria (p.ej., un microorganismo que ha sido modificado genéticamente con un sistema de PUFA sintasa, que utiliza cualquiera de las estrategias de mejora de la producción y/o acumulación de PUFA descritas en la presente memoria y presenta un perfil de ácidos grasos descrito en la presente memoria).

Preferentemente, el producto se selecciona del grupo que consiste en un alimento, un complemento dietético, una formulación farmacéutica, un pienso, una leche animal humanizada y una fórmula infantil. Entre las formulaciones farmacéuticas adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, una formulación antiinflamatoria, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco de la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco anti-*Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, un fármaco para el tratamiento de enfermedades hepáticas degenerativas, un antibiótico y una formulación reductora del nivel de colesterol. Tal como se indica en la presente memoria, el producto se utiliza para tratar una condición seleccionada del grupo que consiste en: inflamación crónica, inflamación aguda, trastorno gastrointestinal, cáncer, caquexia, restenosis cardiaca, trastorno neurodegenerativo, trastorno degenerativo del hígado, trastorno de los lípidos sanguíneos, osteoporosis, osteoartritis, enfermedad autoinmunitaria, preeclampsia, parto pretérmino, maculopatía relacionada con la edad, trastorno pulmonar y trastorno peroxisómico.

Tal como se indica en la presente memoria, los PUFA producidos por los organismos modificados genéticamente o los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incorporarse en un componente alimentario o pienso (p.ej., un complemento alimentario). Los tipos de productos alimentarios en los que pueden incorporarse los PUFA tal como se indica en la presente memoria no se encuentran particularmente limitados y entre ellos se incluyen productos alimentarios tales como productos de panadería fina, pan y rollos, cereales para el desayuno, queso procesado y no procesado, condimentos (kétchup, mayonesa, etc.), productos lácteos (leche, yogur), postres y postres de gelatina, bebidas carbonatadas, tes, mezclas de bebidas en polvo, productos de pescado procesado, bebidas de frutas, goma de mascar, confitería dura, productos lácteos congelados, productos de carne procesada, frutos secos y untables de frutos secos, pasta, productos de ave procesados, salsas de carne y salsas en general, patatas fritas y otros fritos o patatas de bolsa, chocolate y productos de repostería, sopas y mezclas de sopas, productos basados en soja (leches, bebidas, cremas, blanqueadores), untables basados en aceites vegetales y bebidas basadas en verduras.

Entre los ejemplos de alimentos en los que pueden incorporarse los PUFA producidos de acuerdo con el presente método se incluyen, por ejemplo, alimentos para animales de compañía, tales como alimentos para gatos, alimentos para perros y similares, alimentos para peces de acuario, peces o crustáceos de criadero, etc., piensos para animales de cría en granja (incluyendo ganado e incluyendo además peces o crustáceos de producción acuícola). Los organismos modificados genéticamente que contienen PUFA producidos de acuerdo con el presente método, tal como los microorganismos modificados genéticamente, pueden incorporarse directamente en productos de pienso.

#### Definiciones generales y directrices

Según la presente invención, una proteína o ácido nucleico "aislado" es una proteína o ácido nucleico que ha sido sustancialmente separado, producido aparte de o purificado separadamente de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se encuentra naturalmente la proteína o los ácidos nucleicos. "Aislado" afecta a un cambio químico o funcional en la proteína o ácido nucleico (p.ej., puede aislarse un ácido nucleico respecto de un cromosoma mediante la rotura de los enlaces químicos que conectan el ácido nucleico con el ADN restante en el cromosoma). Entre las moléculas de ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aisladas" se incluyen moléculas de ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos estándares de purificación. "Aislado" no refleja el grado en que se ha purificado la proteína o ácido nucleico. El término comprende además ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos sintetizados químicamente. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de ácido nucleico" puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir cadenas tanto de sentido como antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriormente indicados. Nucleótido puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o a una forma modificada de cualquiera de los tipos de nucleótido. La expresión "molécula de ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria es sinónima de "ácido nucleico" y "polinucleótido". Una molécula de ácido nucleico habitualmente presenta una longitud mínima de 10 bases, a menos que se indique lo contrario. El término incluye formas de cadena sencilla y de doble cadena de ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir nucleótidos naturales o modificados, o ambos, unidos entre sí mediante enlaces nucleotídicos naturales y/o no naturales.

Según la presente invención, un ácido nucleico "recombinante" es un ácido nucleico que se construye mediante la unión de dos o más moléculas de ácido nucleico y que puede replicarse en una célula viva. Una realización de la presente invención incluye una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un vector recombinante y una secuencia de ácido nucleico indicada anteriormente. Dicha secuencia de ácido nucleico codifica una proteína o péptido que presenta una actividad biológica de cualquiera de las proteínas EF-X indicadas anteriormente. Según la presente invención, un vector recombinante es una molécula de ácido nucleico manipulada (es decir, producida artificialmente) que se utiliza como herramienta para manipular una secuencia de ácido nucleico seleccionada y para introducir dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. Por lo tanto, el vector recombinante resulta adecuado para la utilización en la clonación, secuenciación y/o, de otro modo, manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada, tal como mediante la expresión y/o introducción de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada en una célula huésped para formar una célula recombinante. Dicho vector típicamente contiene secuencias de ácido nucleico heterólogas, es decir, secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente contiguas a secuencias de ácido nucleico que debe clonarse o transportarse, aunque el vector puede contener además secuencias de ácido nucleico reguladoras (p.ej., promotores, regiones no traducidas) que se encuentran naturalmente contiguas a moléculas de ácido nucleico de la presente invención o que resultan útiles para la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (comentadas en detalle posteriormente). El vector puede ser de ARN o ADN, procariótico o eucariótico, y típicamente es un plásmido. El vector puede mantenerse como elemento extracromosómico (p.ej., un plásmido) o puede integrarse en el cromosoma de un organismo recombinante (p.ej., un microbio o una planta). El vector entero puede mantenerse en su sitio dentro de una célula huésped o, bajo determinadas condiciones, puede deleccionarse el ADN plasmídico, reteniendo la molécula de ácidos nucleicos de la presente invención. La molécula de ácidos nucleicos integrada puede encontrarse bajo el control de un promotor cromosómico, bajo el control de un promotor nativo o plasmídico, o bajo una combinación de varios controles de promotor. Pueden integrarse en el cromosoma una única copia o múltiples copias de la molécula de ácidos nucleicos. Un vector recombinante de la presente invención puede contener por lo menos un marcador seleccionable.

En una realización, un vector recombinante utilizado en una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención es un vector de expresión. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "vector de expresión" se utiliza para referirse a un vector que resulta adecuado para la producción de un producto codificado (p.ej., una proteína de interés). En la presente realización, una secuencia de ácido nucleico codificante del producto que debe producirse (p.ej., un dominio o proteína de PUFA PKS) se inserta en el vector recombinante para producir una molécula de ácido nucleico recombinante. La secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína que debe producirse se inserta en el vector de una manera que enlaza operativamente la secuencia de ácido nucleico con secuencias reguladoras en el vector que permiten la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico dentro de la célula huésped recombinante.

En otra realización, un vector recombinante utilizado en una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención es un vector de transferencia. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "vector de transferencia" se utiliza para referirse a un vector que se utiliza para introducir una molécula particular de ácido nucleico en una célula huésped recombinante, en la que la molécula de ácido nucleico se utiliza para deleccionar, inactivar o sustituir un gen o parte de un gen endógeno dentro de la célula o microorganismo huésped (es decir, se utiliza para la tecnología de disrupción génica dirigida o de inactivación génica). Dicho vector también puede conocerse en la técnica como vector de "knock-out". En un aspecto de la presente realización, una parte del vector, aunque más típicamente, la molécula de ácido nucleico insertada en el vector (es decir, el inserto), presenta una secuencia de ácido nucleico que es homóloga respecto a una secuencia de ácido nucleico de un gen diana en la célula huésped (es decir, un gen que es la diana para la deleción o inactivación). La secuencia de ácido nucleico del inserto vector se diseña para unirse al gen diana de manera que el gen diana y el inserto experimenten recombinación homóloga, de manera que el gen diana endógeno resulta deleccionado, inactivado o atenuado (es decir, por lo menos una parte del gen diana endógeno está mutado o deleccionado), o sustituido. La utilización de este tipo de vector recombinante para sustituir un gen de *Schizochytrium* endógeno, por ejemplo, con un gen recombinante que ha sido descrito anteriormente por los presentes inventores, y la técnica general para la transformación genética de traustocitridios se describe en detalle en la patente US nº 7.001.772.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "lípidos" incluye fosfolípidos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos, triacilgliceroles, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, lisofosfolípidos, jabones, fosfátidos, ceras (ésteres de alcoholes y ácidos grasos), esteroides y ésteres de esteroles, carotenoides, xantófilas (p.ej., oxicarotenoides), hidrocarburos y otros lípidos conocidos por el experto ordinario en la materia.

La referencia a una proteína particular de un organismo específico o a una proteína particular derivada de un organismo específico, tal como "TE2 derivado de *Schizochytrium* sp. ATCC-20888" o "Sz-TE2", a título de ejemplo, se refiere a una TE2 (incluyendo un homólogo de TE2 natural) de un *Schizochytrium* sp. ATCC-20888 o un Sz-TE2 que se ha producido de otro modo a partir del conocimiento de la estructura (p.ej., secuencia) de una TE2 natural de *Schizochytrium*. En otras palabras, un Sz-TE2 incluye cualquier TE2 que presente la estructura y función de una TE2 natural de *Schizochytrium* o que presente una estructura y función que es suficientemente similar a una TE2 de *Schizochytrium* de manera que TE2 sea un homólogo biológicamente activo (es decir, presente actividad biológica)

de una TE2 natural de *Schizochytrium* sp. De esta manera, Sz-TE2 puede incluir proteínas purificadas, parcialmente purificadas, recombinantes, mutadas/modificadas y sintéticas.

Según la presente invención, los términos “modificación” y “mutación” pueden utilizarse intercambiablemente, en particular con respecto a modificaciones/mutaciones de las secuencias de aminoácidos primarias de una proteína o péptido (o secuencias de ácido nucleico) indicadas en la presente memoria. El término “modificación” puede utilizarse además para describir modificaciones post-traduccionales en una proteína o péptido, incluyendo, aunque sin limitación, metilación, farnesilación, carboximetilación, geranyl-geranilación, glucosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación y/o amidación. Entre las modificaciones se pueden incluir, además, por ejemplo, el acomplejamiento de una proteína o péptido con otro compuesto. Dichas modificaciones pueden considerarse mutaciones, por ejemplo, en el caso de que la modificación sea diferente de la modificación post-traducciona que se produce en la proteína o péptido de tipo salvaje natural.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “homólogo” se utiliza para referirse a una proteína o péptido que difiere de una proteína o péptido natural (es decir, la proteína “prototipo” o “de tipo salvaje”) en una o más modificaciones menores o mutaciones en la proteína o péptido natural, pero que mantiene la estructura global básica de la proteína y cadenas laterales de la forma natural (es decir, de manera que el homólogo es identificable como relacionado con la proteína de tipo salvaje). Entre dichos cambios se incluyen, aunque sin limitación, cambios en una o unas cuantas cadenas laterales de aminoácidos (p.ej., 1% o menos), cambios en uno o unos cuantos aminoácidos (p.ej., 1% o menos), incluyendo deleciones (p.ej., una versión truncada de la proteína o péptido), inserciones y/o sustituciones, cambios en la estereoquímica de uno o unos cuantos átomos (p.ej., 1% o menos), y/o derivatizaciones menores, incluyendo, aunque sin limitación, metilación, farnesilación, geranyl-geranilación, glucosilación, carboximetilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación y/o amidación. Un homólogo puede presentar propiedades potenciadas, reducidas o sustancialmente similares a las de la proteína o péptido natural. Los homólogos preferentes de una proteína se describen en detalle posteriormente. Se indica que entre los homólogos se incluyen homólogos producidos sintéticamente, variantes alélicas naturales de una proteína dada o dominio de la misma, o secuencias homólogas de organismos diferentes del organismo del que se ha derivado la secuencia de referencia.

Entre las sustituciones conservadoras se incluyen típicamente sustituciones en los grupos siguientes: glicina y alanina, valina, isoleucina y leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina, serina y treonina, lisina y arginina, y fenilalanina y tirosina. También pueden realizarse sustituciones basándose en la hidrofobicidad o hidrofiliidad conservada (Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105, 1982), o basadas en la capacidad de adoptar una estructura secundaria similar del polipéptido (Chou y Fasman, Adv. Enzymol. 47: 45, 1978).

Los homólogos pueden ser el resultado de variación alélica natural o mutación natural. Una variante alélica natural de un ácido nucleico codificante de una proteína es un gen que se encuentra en esencialmente el mismo locus (o loci) en el genoma ya que el gen que codifica dicha proteína, pero que, debido a variaciones naturales causadas por, por ejemplo, mutación o recombinación, presenta una secuencia similar, aunque no idéntica. Las variantes alélicas típicamente codifican proteínas que presentan una actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el que se están comparando. Una clase de variantes alélicas puede codificar la misma proteína aunque presentar diferentes secuencias de ácidos nucleicos debido a la degeneración del código genético. Las variantes alélicas pueden comprender además alteraciones en las regiones 5' o 3' no traducidas del gen (p.ej., en regiones de control regulatorio). Las variantes alélicas son bien conocidas por el experto en la materia.

Pueden producirse homólogos utilizando técnicas conocidas en la técnica para la producción de proteínas, incluyendo, aunque sin limitación, modificaciones directas de la proteína natural aislada, síntesis directa de la proteína, o modificaciones de la secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína utilizando, por ejemplo, técnicas clásicas de ADN o de ADN recombinante para llevar a cabo mutagénesis aleatoria o dirigida.

Las modificaciones o mutaciones en los homólogos de la proteína, en comparación con la proteína de tipo salvaje, incrementa, reducida o no modifican sustancialmente, la actividad biológica básica del homólogo en comparación con la proteína (de tipo salvaje) natural. En general, la actividad biológica o la acción biológica de una proteína se refiere a una o más funciones mostradas o realizadas por la proteína que se atribuyen a la forma natural de la proteína según se mide u observa *in vivo* (es decir, en el medio fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, bajo condiciones de laboratorio). Las actividades biológicas de los sistemas de PUFA PKS y las proteínas/dominios individuales que constituyen un sistema de PUFA sintasa se han descrito en detalle en otros sitios y en patentes y solicitudes de referencia.

Las modificaciones de una proteína, tal como en un homólogo, pueden resultar en proteínas que presentan la misma actividad biológica que la proteína natural, o en proteínas que presentan una actividad biológica reducida o incrementada en comparación con la proteína natural. Las modificaciones que resultan en una reducción de la expresión de la proteína o en una reducción de la actividad de la proteína, pueden denominarse inactivación (completa o parcial), regulación negativa o acción (o actividad) reducida de una proteína. De manera similar, las modificaciones que resultan en un incremento de la expresión de proteína o en un incremento de la actividad de la proteína pueden denominarse amplificación, sobreproducción, activación, potenciación, regulación positiva o acción (o actividad) incrementada de una proteína. Se indica que la referencia general a un homólogo que presenta la actividad biológica

de una proteína de tipo salvaje no se refiere necesariamente a que el homólogo presenta una actividad biológica idéntica a la de la proteína de tipo salvaje, en particular con respecto al nivel de actividad biológica. Por el contrario, un homólogo puede llevar a cabo la misma actividad biológica que la proteína de tipo salvaje, pero con un nivel de actividad reducido o incrementado en comparación con el de la proteína de tipo salvaje. Un dominio funcional de una proteína es un dominio (es decir, un dominio puede ser una parte de una proteína) que es capaz de llevar a cabo una función biológica (es decir, presenta actividad biológica).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fragmento biológicamente activo" se refiere a una parte de una proteína que mantiene por lo menos parte de la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, el fragmento biológicamente activo de TE2 es una parte de TE2 y mantiene por lo menos parte de la actividad biológica de TE2 que potencia la actividad biológica de la PUFA sintasa en la célula huésped donde se expresa exógenamente TE2.

La expresión "PUFA sintasa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un enzima que produce PUFA (p.ej., LCPUFA), así como un dominio de dicho enzima. Algunas PUFA sintasas específicas se denominan en la presente memoria mediante una notación adicional (p.ej., "PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888"). La expresión "sistema de PUFA sintasa" se refiere a una o más PUFA sintasas y cualquier enzima accesorio que pueda afectar a la función de la PUFA sintasa (p.ej., una PPTasa). Por ejemplo, el sistema de PUFA sintasa en *Schizochytrium* 20888 consiste en las subunidades de la PUFA sintasa nativa y la PPTasa nativa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más molécula de ácido nucleico al interior de una célula. Una célula se "transforma" con una molécula de ácido nucleico transducida al interior de la célula cuando la molécula de ácido nucleico es replicada establemente por la célula, mediante incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o mediante replicación episómica. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "transformación" comprende todas las técnicas mediante las que puede introducirse una molécula de ácido nucleico en dicha célula.

La expresión "identidad de secuencias" o "identidad" tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas puede referirse a los residuos en las dos secuencias que son iguales al alinearse para correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación específica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "porcentaje de identidad de secuencias" puede referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente (p.ej., secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos) a lo largo de una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa el nucleótido o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en, por ejemplo, Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang et al., *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65, 1992; Pearson et al., *Methods Mol. Biol.* 24:307-31, 1994; Tatiana et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50, 1999). Puede encontrarse una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y de cálculo de homologías en, p.ej., Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990).

Se encuentra disponible la herramienta de búsqueda de alineación locales básicas del The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (BLAST™, por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) y en Internet, para la utilización en relación con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando dicho programa se encuentra disponible en internet bajo la sección de "ayuda" de BLAST™. Para las comparaciones de las secuencias de ácido nucleico, puede utilizarse la función de "Alinear dos o más secuencias" del programa BLAST™ (blastn) utilizando los parámetros por defecto. Para las comparaciones de las secuencias de proteína, puede utilizarse la función "Alinear dos o más secuencias" del programa BLAST™ (blastp) utilizando los parámetros por defecto. Tal como se utiliza en la presente memoria, las condiciones de hibridación se refieren a condiciones de hibridación estándares bajo las que se utilizan las moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Tales condiciones estándares se dan a conocer en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Además, las fórmulas para calcular las condiciones apropiadas de hibridación y lavado para conseguir la hibridación permitiendo diversos grados de no correspondencia de los nucleótidos se dan a conocer en, por ejemplo, Meinkoth et al., *Anal. Biochem.* 138, 267 (1984).

Más particularmente, las condiciones de hibridación y lavado de astringencia moderada, tal como se denominan en la presente memoria, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácidos nucleicos que presentan una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 70% respecto a la molécula de ácidos nucleicos que se utiliza para sondear la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten

una no correspondencia de aproximadamente 30% o menos de los nucleótidos). Las condiciones de hibridación y lavado de astringencia elevada, tal como se denominan en la presente memoria, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácidos nucleicos que presentan una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la molécula de ácidos nucleicos que se utiliza para sondear la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten una no correspondencia de aproximadamente 20% o menos de los nucleótidos). Las condiciones de hibridación y lavado de astringencia muy elevada, tal como se denominan en la presente memoria, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácidos nucleicos que presentan una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la molécula de ácidos nucleicos que se utiliza para sondear la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten una no correspondencia de aproximadamente 10% o menos de los nucleótidos). Tal como se ha comentado anteriormente, el experto en la materia puede utilizar las fórmulas en Meinkoth et al., *ibid*. Para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para conseguir estos niveles particulares de no correspondencia de nucleótidos. Tales condiciones variarán, dependiendo de si se forman híbridos de ADN:ARN o de ADN:ADN. Las temperaturas de fusión calculadas para los híbridos de ADN:ADN son 10°C inferiores a las de los híbridos de ADN:ADN. En realizaciones particulares, entre las condiciones de hibridación restrictivas para los híbridos de ADN:ADN se incluyen la hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC ( $\text{Na}^+$  0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 35°C (astringencia más baja), más preferentemente de entre aproximadamente 28°C y aproximadamente 40°C (mayor astringencia) y todavía más preferentemente, de entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C (todavía más astringencia), con condiciones de lavado apropiadas. En realizaciones particulares, entre las condiciones de hibridación restrictivas para los híbridos de ADN:ARN se incluyen la hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC ( $\text{Na}^+$  0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 45°C, más preferentemente de entre 38°C y aproximadamente 50°C, y todavía más preferentemente, de entre aproximadamente 45°C y aproximadamente 55°C, con condiciones de lavado de astringencia similar. Estos valores se basan en cálculos de una temperatura de fusión para moléculas de más de aproximadamente 100 nucleótidos, 0% de formamida y un contenido de G + C de aproximadamente 40%. Alternativamente,  $T_m$  puede calcularse empíricamente tal como se indica en Sambrook et al., *supra*, páginas 9.31 a 9.62. En general, las condiciones de lavado deberían ser tan astringentes como resulte posible y deben resultar apropiadas para las condiciones de hibridación seleccionadas. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden incluir una combinación de condiciones salinas y de temperatura que sean aproximadamente 20-25°C inferiores a la  $T_m$  calculada de un híbrido particular, y las condiciones de lavado típicamente incluyen una combinación de condiciones salinas y de temperatura que son aproximadamente 12-20°C inferiores a la  $T_m$  calculada del híbrido particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación adecuadas para la utilización con híbridos de ADN:ADN incluye una hibridación de 2 a 24 horas en 6X SSC (formamida al 50%) a aproximadamente 42°C, seguido de etapas de lavado que incluyen uno o más lavados a temperatura ambiente en aproximadamente 2X SSC, seguido de lavados adicionales a temperaturas más altas y una fuerza iónica más baja (p.ej., por lo menos un lavado a aproximadamente 37°C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC, seguido de por lo menos un lavado a aproximadamente 68°C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC).

Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

El ejemplo siguiente describe el desarrollo de un ensayo utilizado para identificar factores que pueden potenciar la actividad enzimática de las PUFA sintasas.

El ensayo *in vitro* se desarrolló para identificar cualesquiera factores presentes en homogenados celulares de *Schizochytrium* 20888 que podrían facilitar la actividad de un sistema de PUFA sintasa. El ensayo se basaba en la observación de que la adición de un extracto derivado de una cepa de *Schizochytrium* 20888 a un homogenado de *E. coli* que expresa la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 (más HetI) resultaba en un incremento de la actividad *in vitro* de ese sistema de PUFA sintasa (ver las dos muestras a la izquierda en la fig. 2, es decir, BUFF K y Q-KO). Las características generales de este ensayo se describen a continuación.

*Preparación de homogenados de una cepa de E. coli que expresa la PUFA sintasa de Schizochytrium 20888 para la utilización en el ensayo de potenciación de PUFA sintasa:* las subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI (procedente de *Nostoc* sp.) se expresaron en *E. coli* cepa JK824 tal como se indica en Hauvermale et al., *Lipids* 41:739-747, 2008, y Metz et al., solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599. Los genes de subunidad de PUFA sintasa se expresaron como operón sintético bajo el control del sistema de promotor de T7 mientras que HetI se expresaba constitutivamente en un plásmido separado. Para los ensayos bioquímicos, la cepa JK824 se cultiva típicamente en caldo de Luria complementado con glicerol al 10% a 30°C hasta una D.O. (600 nm) de ~1 y después se añadió  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) (hasta una concentración final de 1 mM) para inducir la producción de la polimerasa de T7. Aproximadamente 4 horas después de la inducción, se recolectaron las células, se lavaron y se resuspendieron en tampón KE (tampón K -  $\text{NaPO}_4$  50 mM, pH 6,8 con glicerol al 10% - que contenía además EDTA 1 mM y ditioneitol 2 mM). Las células se rompieron mediante el paso por una prensa francesa celular

(16.000 psi) y el homogenado se separó en alícuotas y se almacenó a -80°C para la utilización en el ensayo de potenciación de la actividad de la PUFA sintasa.

5 *Ensayos de potenciación de la actividad in vitro de la PUFA sintasa:* el ensayo *in vitro* de PUFA sintasa implica la medición de la radioactividad, de malonil-CoA marcada con <sup>14</sup>C, incorporada en DHA y DPAn-6. Las características generales de un ensayo de PUFA sintasa se describen en Metz et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 47:472-478, 2009. El ensayo de potenciación típico presentaba un volumen final de 100 µl - consistía en 40 µl del homogenado derivado de *E. coli* cepa JK824 (descrito anteriormente), 40 µl de una muestra a evaluar (p.ej., homogenados de cepas de *Schizochytrium* o fracciones cromatográficas) y 10 µl de cóctel de reacción (que contenía una mezcla fría de [2-<sup>14</sup>C]-malonil-CoA y NADPH). El homogenado de JK824 y la muestra que debía evaluarse se mezclaron inmediatamente antes de la adición del cóctel de reacción. Los componentes del cóctel de reacción se ajustaron de manera que las concentraciones finales de malonil-CoA y NADPH en el ensayo fueran de 50 µM y 2 mM, respectivamente. El tampón K sirvió de control negativo para la potenciación de la actividad y también se utilizó para ajustar el volumen de las muestras bajo evaluación a 40 µl al someter a ensayo menos de dicha cantidad. Las reacciones de ensayo se llevaron a cabo en tubos de vidrio en un baño de agua a temperatura ambiente (~21°C). El tiempo de incubación era dependiente de los requisitos experimentales.

20 Los productos de ensayo *in vitro* de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 eran ácidos grasos libres (Metz et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 47:472-478, 2009). La incorporación de radioactividad en estos ácidos grasos libres se midió rutinariamente mediante extracción con solventes orgánicos y la separación de clases lipídicas en placas de cromatografía de capa fina (CCF). Ocasionalmente, los lípidos extraídos se convirtieron en FAME antes de la separación en placas de CCF para confirmar que DHA y DPAn-6 eran los ácidos grasos primarios que se marcaban en el ensayo. Las reacciones de ensayo *in vitro* se detuvieron mediante uno de dos métodos según el protocolo de tratamiento. Para la conversión de ácidos grasos en metil-ésteres de ácido graso (FAME, por sus siglas en inglés) utilizando un método ácido, la reacción se detuvo mediante la adición del reactivo FAME (ver posteriormente). Para la extracción de lípidos sin derivatización, la reacción se detuvo mediante la adición de 125 µl de isopropanol:ácido acético (4:1 v/v) (ver posteriormente).

30 *Protocolo de FAME ácido:* la reacción se detuvo mediante la adición de 2,0 ml de HCl al 4% en metanol más 50 µl de tolueno; se sellaron los tubos de vidrio con tapones revestidos de Teflon y se calentaron a 100°C durante 1 h. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, después se añadió 1,0 ml de hexano y 0,5 ml de agua, se agitó adicionalmente con vórtex y después se dejó que se separase. Si se desea, una parte puede separarse para el recuento de centelleo líquido (LSC, por sus siglas en inglés). Se transfirió una alícuota de ~600 µl de fase orgánica a un tubo nuevo y se eliminó el solvente bajo N<sub>2</sub>. Se disolvió el residuo en 50 µl de hexano y se aplicó como mancha sobre placas de CCF de gel de sílice 60 A (revelado con hexano:éter dietílico:ácido acético - 70:30:2) o placas de gel de sílice G empapadas en 10% de AgNO<sub>3</sub>/90% de acetonitrilo (activado durante 30 min a 100°C antes de la utilización) (revelado con hexano:éter dietílico/ácido acético - 70:20:2). Las placas se dejaron secar al aire y se detectaron las zonas radioactivas utilizando tecnología de Phosphorimager.

40 *Protocolo de HIP - extracción de lípidos no derivatizados:* Tal como se ha indicado anteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de 125 µl de isopropanol:ácido acético (4:1 v/v), seguido de la adición de 2 ml de hexano:isopropanol (3:2 v/v), se agitó con vórtex adicionalmente y después se añadió 1 ml de sulfato sódico al 6,7% (p/v) y se agitó con vórtex nuevamente. Se dejó que se separasen las fases. Si se desea, una parte de la fase orgánica (superior) se transfirió para LSC y después se transfirió el resto (-1,0 ml) a un tubo nuevo. El solvente se eliminó con gas N<sub>2</sub> y el residuo se disolvió en 50 µl de hexano. Se aplicó la muestra en puntos sobre una placa de CCF de gel de sílice 60 A y se reveló con hexano:éter dietílico:ácido acético (70:30:2). Las placas se dejaron secar al aire y se detectaron las zonas radioactivas utilizando tecnología de Phosphorimager.

50 *Ensayo para identificar las proteínas factores potenciadores de PUFA sintasa:* para el ensayo de potenciación de PUFA sintasa, los extractos derivados de una de entre varias cepas de *Schizochytrium* se agruparon con el extracto de *E. coli* anteriormente indicado antes de la adición de malonil-CoA marcado con <sup>14</sup>C y NADPH. Las reacciones en las que se agrupó la solución tampón de extracción con el material de *E. coli* en lugar de los extractos celulares sirvieron de controles negativos. Se utilizaron varias cepas para estos experimentos.

## 55 Ejemplo 2

El ejemplo siguiente describe las cepas, derivadas de *Schizochytrium* 20888, que se utilizaron para revelar el ensayo de potenciación *in vitro* de PUFA sintasa y para identificar los factores potenciadores.

60 Quad K-O: Quad-KO es una cepa de *Schizochytrium* 20888 en la que los marcos de lectura (Orf, por sus siglas en inglés) de las tres subunidades de PUFA sintasa y el Orf FAS se deleccionaron y se sustituyeron por casetes génicos de resistencia a antibiótico. La cepa se creó utilizando los métodos descritos en Hauvermale et al., *Lipids* 41: 739-747, 2008, Metz et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 47:472-478, 2009, y Roessler et al., 2006, patente US nº 7.001.772. La cepa Quad-KO requiere la complementación del medio con ácidos grasos tanto saturados como poliinsaturados de cadena larga para el crecimiento. Los homogenados de esta cepa no presentan la capacidad de incorporar radioactividad de <sup>14</sup>C-malonil-CoA en los ácidos grasos que son fácilmente extraídos con solventes

orgánicos. Los extractos de esta cepa se han utilizado para establecer los parámetros iniciales para el enriquecimiento cromatográfico de los factores responsables para la potenciación de la actividad de PUFA sintasa en los ensayos *in vitro*.

5 AC66: La pared celular de *Schizochytrium* 20888 resulta difícil de romper, provocando de esta manera que la preparación de los homogenados si células resulte un reto. AC66 es una cepa de *Schizochytrium* 20888 que ha sido seleccionada después de la mutagénesis química basada en la morfología de las colonias y posteriormente se ha encontrado que resulta fácilmente rota mediante sonicación. El perfil de ácidos grasos y las propiedades de acumulación de aceites de la cepa AC66 resultan muy similares a las de su pariente. La facilidad de la disrupción celular mediante sonicación simplifica en gran medida la preparación de homogenados sin células para el trabajo bioquímico.

10 AC66/DGAT KO: AC66/DGAT KO es una cepa derivada de AC66 en la que un gen codificante de una diacil glicerol aciltransferasa particular en *Schizochytrium* 20888 ha sido inactivado (descrita en Metz et al., 2013, solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599, al que se hace referencia en dicha patente como DAGAT-1). Esta cepa, aunque prototrófica, no acumula cantidades significativas de aceites. La falta de aceites simplifica el análisis bioquímico y las etapas iniciales de enriquecimiento cromatográfico de los factores potenciadores de PUFA sintasa.

### 20 Ejemplo 3

El ejemplo a continuación describe un procedimiento para el enriquecimiento cromatográfico del factor o factores potenciadores de la actividad *in vitro* de la PUFA sintasa (EF-X) de extractos derivados de cepas de *Schizochytrium* 20888. Se determinó seguidamente mediante los experimentos descritos en el Ejemplo 4, que EF-X de extractos derivados de las cepas de *Schizochytrium* 20888 contienen de hecho dos factores potenciadores. Sz-TE2 y Sz-TE3.

25 Se sometieron a ensayo varias matrices cromatográficas para la utilización en el enriquecimiento de EF-X. Se llevaron a cabo ensayos iniciales utilizando extractos de la cepa Quad-KO, ya que no posee actividades de FAS y PUFA sintasa que podría confundir el ensayo de potenciación. Posteriormente se encontró que, mediante la utilización de condiciones apropiadas, la actividad de EF-X presentes en extractos sin células de *Schizochytrium* 20888 podría separarse limpiamente respecto de tanto las actividades de FAS y PUFA sintasa mediante la utilización de una columna Mimetic Blue A SA. El material de partida utilizada para el ejemplo descrito posteriormente se derivado de la cepa AC66/DGAT-KO de *Schizochytrium* 20888.

35 *Preparación de homogenado sin células:* las células de la cepa AC66/DGAT-KO se cultivaron hasta la etapa media de crecimiento logarítmico, se recolectaron mediante centrifugación, se resuspendieron en 'tampón K' (NaPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6,8 con glicerol al 10%) y se lisaron mediante sonicación. El homogenado se centrifugó (100.000 x g x 1 h) y se recolectó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0,2 µm, rindiendo el material de partida (S100F) utilizado para la cromatografía.

40 *Cromatografía Mimetic Blue SA:* se utilizó una matriz Mimetic Blue SA (Blue SA) para la etapa cromatográfica inicial. Se cargaron aproximadamente 50 ml de S100F en una columna de 10 ml que había sido equilibrada con tampón K. La columna se lavó con tampón K y después con tampón K que contenía NaCl 0,24 M. La actividad de EF-X unida se eluyó con un gradiente salino lineal (NaCl 0,24 M a 2 M durante 40 ml). Se recolectaron fracciones (5 ml) y se sometieron a ensayo. Aquellas con la actividad de EF-X más alta (en la parte intermedia del gradiente) se agruparon y se llevaron a la etapa siguiente.

50 *Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH):* una parte (10 ml) del material agrupado de la columna Blue SA se cargó directamente en un cartucho HiTrap Phenil-FF de 1 ml (GE Healthcare) que había sido equilibrado con tampón K que contenía NaCl 2 M. Tras el lavado con tampón de equilibrado, se eluyó la actividad de EF-X unida utilizando un gradiente salino inverso de 10 volúmenes de columna (NaCl 2 M a 0 M en tampón K). Las fracciones activas de múltiples tandas se agruparon para la etapa siguiente. La columna se lavó con NaOH 0,5 M entre tandas.

55 *Cromatografía de intercambio catiónico:* las fracciones agrupadas de la etapa de CIH se concentraron y se desalaron utilizando columnas de centrifugación mediante ultrafiltración. Una parte (2 ml) del material desalado se cargó en una columna de intercambio catiónico UNO-S de 1 ml (Bio-Rad) que había sido equilibrada con tampón K. Tras el lavado con tampón K, la actividad de EF-X unida se eluyó utilizando un gradiente salino de 10 volúmenes de columna (NaCl 0 M a 1 M en tampón K). Se recolectaron fracciones (0,5 ml) y se sometió a ensayo la actividad de EF-X.

60 *Cromatografía de exclusión por tamaños:* se agruparon dos fracciones de la columna de intercambio catiónico con la actividad de EF-X más alta y después se concentraron y se desalaron utilizando columnas de centrifugación de ultrafiltración. Una parte (500 µl) de este material se cargó en una columna SuperDex 200 (GE Health Care) que había sido equilibrada con tampón K. Se retuvo la actividad de EF-X en la matriz y se eluyó como un pico único con una masa molecular aparente, estimada mediante comparación con estándares de proteínas, de 40 a 80 kDa. El análisis de SDS-PAGE (con tinción de plata del gel) reveló únicamente unas cuantas bandas polipeptídicas claras en las fracciones con actividad de EF-X, y sólo tres bandas con intensidad de tinción aparentemente correlacionada con la actividad detectada en esas mismas fracciones. Las masas moleculares de estas proteínas se estimó que eran de -

80 kDa, -37 kDa y -17 kDa, mediante comparación con los estándares de proteínas separados en el mismo gel. Las partes de las fracciones relevantes de la columna SuperDex 200 se utilizaron para la generación de péptidos y los procedimientos de secuenciación. Se llevó a cabo la secuenciación de péptidos junto con la base de datos de genoma de *Schizochytrium* 20888 y se identificaron todos los candidatos de EF-X.

#### Ejemplo 4

El ejemplo a continuación describe el procedimiento utilizado para identificar dos proteínas candidatas para la asociación con la potenciación de la actividad de PUFA sintasa *in vitro* y la caracterización molecular de esos candidatos.

Se llevó a cabo análisis de CL-EMEM (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem) en péptidos trípticos generados a partir de fracciones derivadas de la etapa cromatográfica final (separación en columna SuperDex 200) del Ejemplo 2. Se identificaron las proteínas candidatas para la asociación con EF-X de *Schizochytrium* 20888. El método implica la secuenciación mediante CL-EMEM (con una secuencia genómica de *Schizochytrium* 20888 derivada de la base de datos de proteínas predichas como referencia) en combinación con la correlación de la abundancia relativa de péptidos determinada mediante recuento espectral de los datos de CL-EMEM con los resultados del ensayo de actividad de EF-X para cada fracción. Se generó una lista de 17 proteínas candidatas. Se identificaron los dos candidatos superiores como probables tioesterasas mediante análisis de BLAST. Ambos candidatos mostraron homología respecto a tioesterasas de tipo 4-hidroxibenzoil-CoA. Las secuencias de nucleótidos predichas y las traducciones de aminoácidos deducidas de los dos Orf candidatos se proporcionan en la Lista de secuencias y se describen posteriormente. Las proteínas candidatas se denominan Sz-TE2 y Sz-TE3. La proteína Sz-TE2 es probable que esté asociada a la banda de ~17 kDa identificada en el gel con tinción de plata mencionado en el ejemplo anterior, mientras que Sz-TE3 probablemente está asociado a la banda de ~37 kDa. El tercer resultado más alto en la lista de recuento espectral aparentemente se encontraba correctamente anotado en la base de datos del genoma y mostraba una homología muy elevada respecto a un enzima bifuncional de la ruta de degradación de ácidos grasos. Esta proteína probablemente está asociada a la banda de ~80 kDa identificada en el gel con tinción de plata. Se llevó a cabo trabajo de seguimiento con los candidatos Sz-TE2 y Sz-TE3. Las características moleculares de los marcos de lectura abierta y proteínas codificadas predichas se describen a continuación:

Sz-TE2: la secuencia de nucleótidos del Orf de Sz-TE2 predicho contenía 411 pb (sin el codón de parada) y la traducción codificaba una proteína de 15,6 kDa con 137 aminoácidos. Un análisis de BLAST de la secuencia de nucleótidos frente a una base de datos propietaria de EST de *Schizochytrium* 20888 identificó tres correspondencias que confirmaron la Orf entera entre ATG y un codón de parada TGA. La secuencia de nucleótidos de Orf se muestra en la SEC ID nº 5 y la traducción se muestra en la SEC ID nº 1. Tal como se indica, el análisis de BLAST de la secuencia de proteína Sz-TE2 revela homología respecto a las tioesterasas de tipo 4-hidroxibenzoil-CoA.

Sz-TE3: la Orf de Sz-TE3 anotada en la base de datos propietaria de secuencias genómicas se predijo que codificaba 881 aminoácidos y la región codificante contenía 3 intrones dentro de la longitud global del gen (inicio a parada) de 6.800 pb. Una búsqueda en la base de datos EST propietaria de *Schizochytrium* 20888 con la secuencia entera reveló que sólo la parte 3' presentaba correspondencias. Las ocho EST identificadas en la búsqueda de BLAST formó un contig que incluía una Orf (de ATG a una parada TGA) la secuencia de la cual se correspondía con la de los datos genómicos. La Orf para la región confirmada por las EST contenía 963 nucleótidos (sin el codón de parada) que codificaba una proteína de 36,6 kDa con 321 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos de la Orf de Sz-TE3 se muestra en la SEC ID nº 6 y la traducción se muestra en la SEC ID nº 2. El análisis de BLAST de la secuencia de la proteína Sz-TE3 también revela homología respecto a las tioesterasas de tipo 4-hidroxibenzoil-CoA, aunque en este caso existen dos regiones similares, es decir, dos regiones contiguas, ambas con homología respecto a las tioesterasas de tipo 4-hidroxibenzoil-CoA.

#### Ejemplo 5

El ejemplo a continuación describe la verificación de que las proteínas candidatas, Sz-TE2 y Sz-TE3, en efecto están asociadas a la potenciación de la actividad de la PUFA sintasa *in vitro* de *Schizochytrium* 20888 y sugiere que presentan una actividad óptima al expresarse juntas.

*Construcción de plásmidos de expresión de E. coli que contienen Sz-TE2 y Sz-TE3:* las Orf codificantes de Sz-TE2 y Sz-TE3 se clonaron separadamente y juntas en dos vectores Novagen Duet: pETDuet™ (portador del marcador de resistencia Amp) y pCOLADuet™ (portador del marcador de resistencia Kan). En ambos casos, se clonó la Orf de Sz-TE2 en el MCS-2 y Sz-TE3 se clonó en el MCS-1. Las Orf de las secuencias de nucleótidos finales de ambas Orf en los constructos eran idénticas a las secuencias nativas. Los plásmidos Novagen Duet utilizan el sistema de expresión de T7 y requieren líneas de células huésped que contienen una polimerasa de T7 inducible, p.ej., BLR(DE3) o BL21(DE3). Se utilizó IPTG (0,5 mM) para inducir la expresión de los genes.

*Expresión de Sz-TE2 y Sz-TE3 en E. coli:* ensayos de solubilidad de las proteínas: Se llevó a cabo un ensayo de solubilidad de las proteínas Sz-TE2 y Sz-TE3 en *E. coli* mediante la expresión de las proteínas, separadamente o juntas, recogiendo las células inducidas y utilizando el reactivo "BugBuster®" de Novagen y el protocolo de centrifugación para separar las proteínas solubles de los residuos celulares y de las proteínas no solubles. Las muestras de células completas y las fracciones solubles y no solubles se trataron con SDS y se analizaron mediante

SDS-PAGE. Un gel teñido con azul de Coomassie en el que las proteínas presentes en células completas y las fracciones 'soluble' y 'no soluble' de las diferentes cepas de *E. coli* habían sido separadas, fue examinado. Esto reveló la presencia de una banda de proteína bien teñida asociada a Sz-TE2 en las fracciones solubles, tanto expresada sola como coexpresada con Sz-TE3. En contraste, al expresar Sz-TE3 sola, se detectó muy poca proteína en la fracción soluble, mientras que se encontraba presente una banda prominente en la fracción no soluble. Al coexpresar Sz-TE3 con Sz-TE2, la mayor parte de la proteína Sz-TE3 ahora se detectaba en la fracción soluble. Estos datos sugieren una interacción entre Sz-TE3 y Sz-TE2 que incrementa la solubilidad de Sz-TE3. También indican que la determinación de la actividad de Sz-TE3 al expresarla sola en este sistema particular de *E. coli* puede verse comprometida por su falta de solubilidad.

*Utilización de Sz-TE2 y Sz-TE3 expresados en E. coli en el ensayo de potenciación de la actividad de PUFA sintasa:* las Orf codificantes de los candidatos Sz-TE2 y Sz-TE3 de EF-X de *Schizochytrium* 20888 se clonaron separadamente y juntas en los vectores Novagen Duet, tal como se ha indicado anteriormente. Las cepas de *E. coli* que contenían los constructos de TE se cultivaron en medio LB a 32°C. Se indujo la expresión mediante la adición de IPTG y la incubación continuó durante 3 a 5 horas. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón K (NaPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6,8, glicerol al 10%) y se lisaron utilizando una celda de prensa francesa (16.000 psi - dos pases). Alícuotas de los homogenados se almacenaron directamente o se centrifugaron (20.000 x g durante 20 min), rindiendo una fracción de sobrenadante (S20) antes de dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C. Los homogenados y fracciones de sobrenadante se diluyeron 6X en tampón K antes de agruparse con el homogenado preparado separadamente de JK824 (que expresaba los genes de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI) para el ensayo de potenciación. En algunos ensayos, se agruparon volúmenes iguales de extractos procedentes de cepas que expresaban Sz-TE2 o Sz-TE3 - en caso de someterse a ensayo solos, se utilizó tampón K para igualar los volúmenes. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de <sup>14</sup>C-malonil-CoA más NADPH y se produjeron durante 20 a 30 min a temperatura ambiente (~21°C) y después se detuvieron mediante adición de isopropanol/ácido acético. Se extrajeron los lípidos neutros utilizando una solución de hexano/isopropanol y se separaron mediante CCF de fase normal (Metz et al., Plant Physiology and Biochemistry, 47:472-478, 2009). La figura 1 muestra los resultados de los ensayos de actividad al agrupar los extractos (fracciones de homogenado o de sobrenadante) de estas cepas, o tampón K, con extractos de JK824. 2H y 3H se refieren a Sz-TE2 y Sz-TE3, respectivamente, en fracciones de homogenado. 2S y 3S se refieren a Sz-TE2 y Sz-TE3, respectivamente, en fracciones de sobrenadante. Los datos en la figura indican que, aunque la adición de Sz-TE2 o Sz-TE3 por sí solos, no potencian la actividad de PUFA sintasa, se obtenía una potenciación significativa (6 a 9 veces) al agruparlas. Además, el efecto de potenciación se observó tanto con las fracciones de homogenado como en las de sobrenadante. Estos resultados confirman que los candidatos, Sz-TE2 y Sz-TE3, en efecto están asociados a la actividad de EF-X y que ambos es probable que resulten necesarios para esa actividad.

#### Ejemplo 6

El ejemplo a continuación describe los efectos de la inactivación de los genes de Sz-TE2 o Sz-TE3 en la cepa Quad-KO de *Schizochytrium* 20888 sobre la actividad de EF-X en extractos derivados de dichas cepas. Los resultados indican que los genes de Sz-TE2 y Sz-TE3 codifican los factores primarios asociados a la actividad de potenciación *in vitro* de la PUFA sintasa en extractos de *Schizochytrium* 20888.

*Construcción de casetes de plásmido KO de Sz-TE2 y Sz-TE3:* la actividad de potenciación *in vitro* de la PUFA sintasa se caracterizó originalmente mediante el agrupado de extractos de *E. coli* con extractos preparados a partir de la cepa Quad-KO de *Schizochytrium* 20888. En esta cepa, los genes codificantes de la proteína FAS y las tres subunidades de la PUFA sintasa se inactivaron mediante sustitución de las regiones codificantes por casetes de resistencia a antibióticos. Para la inactivación de los genes SzTE en la cepa Quad-KO, se construyeron plásmidos en los que las regiones codificantes de Sz-TE2 o Sz-TE3 habían sido sustituidos por otro casete de resistencia a antibiótico (paromomicina). La transformación de la cepa Quad-KO se llevó a cabo utilizando el sistema Biolistic (Roessler et al., 2006, patente US nº 7.001.772) y se seleccionaron colonias resistentes a paromomicina en placas complementadas con tanto ácidos grasos saturados de cadena corta como con DHA. Las estructuras de los loci de Sz-TE2 y Sz-TE3 en las cepas KO putativas se verificaron mediante secuenciación de fragmentos de PCR clonados que se habían generado mediante la utilización de cebadores dirigidos a regiones fuera del ADN flanqueante utilizado en los casetes de transformación. Se cultivaron dos transformantes independientes de los KO de Sz-TE2 y Sz-TE3 en medio líquido; se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón K. Se prepararon homogenados celulares mediante agitación con perlas de vidrio que después se separaron de los homogenados mediante filtración. A continuación, se centrifugaron los homogenados (20.000 x g durante 10 min), rindiendo una fracción (S20) que se utilizó en el ensayo de potenciación de la actividad *in vitro* de PUFA sintasa. La figura 2 muestra los resultados de dichos ensayos junto con la actividad del extracto de *E. coli* mismo (en combinación con tampón K) y una muestra a la que se había añadido una fracción S20 procedente de la cepa Quad-KO parental. La adición del extracto Quad-KO resultó en un incremento de ~8 veces en actividad de PUFA sintasa en el ensayo (una potenciación de actividad típica observada con este tipo de extracto). La utilización de los extractos de las cepas en las que se había interrumpido el gen de Sz-TE2 o de Sz-TE3 resultó en sólo un incremento menor de la actividad de PUFA sintasa expresada en *E. coli*. Estos datos demuestran que Sz-TE2 y Sz-TE3 son responsables de la mayor parte de las actividades de potenciación observadas en extractos de células de *Schizochytrium* 20888 y que la expresión de genes de Sz-TE2 y de Sz-TE3 resulta necesaria para la producción de la actividad de potenciación.

Ejemplo 7

5 El ejemplo a continuación describe los efectos de inactivación de Sz-TE2 y Sz-TE3 y ambos genes en *Schizochytrium* 20888. Los resultados revelan las funciones *in vivo* de Sz-TE2 y Sz-TE3: aunque DHA y DPAn-6 siguen acumulándose en la cepa KO, sus niveles están significativamente reducidos.

10 Las proteínas Sz-TE2 y Sz-TE3 fueron identificadas en un ensayo de potenciación *in vitro* de PUFA sintasa. El papel potencial de estas proteínas en la producción y acumulación de PUFA en células de *Schizochytrium* 20888 se investigó mediante inactivación de los genes correspondientes en el fondo de *Schizochytrium* 20888 de tipo salvaje. Se prepararon constructos de Sz-TE2 y Sz-TE2 KO utilizando los métodos descritos anteriormente. Para este experimento, la región codificante de Sz-TE2 se sustituyó por un casete de resistencia a paromomicina y Sz-TE3 por un casete de resistencia a zeocina. Se inactivaron Sz-TE2 y Sz-TE3 separadamente en ese fondo, generando las cepas Sz-TE2 y Sz-TE3 KO. A continuación, se crearon las cepas boles Sz-TE KO mediante transformación con el segundo constructo KO. Los transformantes resistentes a antibióticos que crecían en placas que no habían sido complementadas con DHA se obtuvieron para tanto los genes KO únicos como dobles. Las sustituciones por inserción de los genes TE por los casetes de resistencia a antibióticos para varios de los KO se confirmaron mediante clonación y secuenciación del producto de PCR utilizando cebadores con diana en regiones de ADN situadas fuera del ADN flanqueante utilizado para los constructos KO. Las células de la cepa de tipo salvaje, así como ejemplos de las cepas TE KO únicas y dobles se cultivaron, se recolectaron y se determinaron sus perfiles de ácidos grasos. Tabla I-A muestra perfiles típicos de ácidos grasos, mostrados como % de los FAME totales, obtenidos para estas cepas, mientras que la Tabla I-B muestra esos perfiles expresados como mg de los FAME individuales por gramo de biomasa seca. Puede observarse que la totalidad de las tres versiones de las cepas Sz-TE KO (Sz-TE2 KO, Sz-TE3 KO y KO doble) presentan perfiles de ácidos grasos bastante similares. Aunque la totalidad de las cepas acumula DHA, las cantidades de ácido graso se han reducido significativamente en comparación con el tipo salvaje. En el ejemplo mostrado, se redujo DHA desde ~40% de FAME totales en el tipo salvaje a ~34% en TE2 KO y a ~30% en el TE3 y KO dobles. La mayor cantidad de DHA detectada en la cepa Sz-TE2 KO respecto a aquellas en las que se había inactivado Sz-TE3 sugiere que Sz-TE3 podría presentar alguna actividad por sí solo. Además, la proporción de DHA a DPAn-6 en todas las cepas se ha reducido, de ~2,3 en la cepa parental a <2 en todas las cepas TE KO. Aunque el nivel de DPAn-6, como % de las FAME totales, no se ha alterado significativamente en las cepas KO, la cantidad producida - al calcular como mg de FAME DPAn-6 por gramo de biomasa, se ha reducido. Aunque la reducción de DHA y DPAn-6 en las cepas KO se ha compensado parcialmente mediante un incremento en otros ácidos grasos (derivados de los FAS), el total de mg de FAME todavía se encuentra reducido (Tabla I-B). Estos datos indican que, aunque los productos de la PUFA sintasa (DHA y DPAn-6) todavía se acumulan en las cepas de *Schizochytrium* 20888 en la que los genes de Sz-TE2 y/o Sz-TE3 han sido inactivados, los niveles de estos dos PUFA, son más elevados en el caso de que ambos genes se encuentren intactos. Los datos proporcionan una explicación de por qué se observa la acumulación de DHA y DPAn-6 al expresar la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 (junto con una PPTasa apropiada) en organismos heterólogos y sugiere que la coexpresión de Sz-TE2 más Sz-TE3 podría ser un medio para incrementar la acumulación en estas células.

40

Tabla I-A

	20888	X022-1	X023-17	X024-2	X024-4
Ácido graso	WT	SzTE2 KO	SzTE3 KO	SzTE2+3 KO	SzTE2+3 KO
C14:0*	4,9	3,2	4,3	6,0	5,4
C16:0*	29,6	30,3	34,6	40,1	35,8
C16:1*	0,9	2,4	3,4	2,5	2,5
C18:0*	0,9	1,6	1,8	1,6	1,5
C18:1 N7	0,6	2,8	3,8	2,4	2,8
C20:5 N3*	1,0	1,5	1,1	0,9	0,9
C22:4 N9	0,7	1,4	1,3	1,0	1,1
C22:5 N6*	17,7	18,5	16,3	14,3	16,7
C22:6 N3*	40,4	34,3	29,8	27,9	29,2
DHA:DPAn6	2,3	1,9	1,8	1,9	1,7
DHA + DPAn6	58,1	52,8	46,1	42,2	45,8

45 La Tabla I-A muestra los perfiles de ácidos grasos - como % de los FAME totales - de *Schizochytrium* 20888 de tipo salvaje y las cepas en las que los genes siguientes se han inactivado mediante mutagénesis por inserción: Sz-TE2 (X022-1) o Sz-TE3 (X023-17) o ambos, Sz-TE2 y Sz-TE3 (X024-2 y X024-4). Sólo se muestran los ácidos grasos con niveles >1% de los FAME totales.

Tabla I-B

	20888	X022-1	X023-17	X024-2	X024-4
Ácido graso	WT	SzTE2 KO	SzTE3 KO	SzTE2+3 KO	SzTE2+3 KO
C14:0*	14,1	7,2	10,1	15,4	13,5
C16:0*	85,7	67,3	81,3	103,0	88,8
C16:1*	2,5	5,3	7,9	6,5	6,1
C18:0*	2,6	3,6	4,2	4,2	3,8
C18:1 N7	1,7	6,2	9,0	6,2	7,0
C20:5 N3*	2,9	3,3	2,7	2,4	2,3
C22:4 N9	2,0	3,2	3,0	2,6	2,6
C22:5 N6*	51,1	41,1	38,3	36,9	41,3
C22:6 N3*	116,9	76,1	70,0	71,7	72,2
Suma de FAME	289,4	222,0	235,3	257,0	247,8

La Tabla I-B muestra los perfiles de ácidos grasos - mg de FAM por gramo de biomasa seca: de *Schizochytrium* 20888 de tipo salvaje y cepas en las que los genes siguientes han sido inactivados mediante mutagénesis por inserción. Sz-TE2 (X022-1) o Sz-TE3 (X023-17) o ambos, Sz-TE2 y Sz-TE3 (X024-2 y X024-4). Sólo se muestran los ácidos grasos listados en la Tabla I-A.

#### Ejemplo 8

El ejemplo a continuación describe el efecto sobre los perfiles de ácidos grasos de la coexpresión de Sz-TE2 y Sz-TE3 en *E. coli* que expresa la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI. Los datos indican que la acumulación de los productos de la PUFA sintasa (DHA y DPA n-6) pueden incrementarse mediante la coexpresión de Sz-TE2 y Sz-TE3.

La expresión de las subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 junto con HetI en *E. coli* resulta en la acumulación de DHA y DPA n-6 (ver Hauvermale et al., Lipids 41:739-747, 2008 para más información). Además, se determinó que la totalidad de los PUFA en dichas células se encuentran en forma de ácido graso libre, y no esterificados (p.ej., como componentes de fosfolípidos). Esta observación es consistente con los resultados de los ensayos de actividad *in vitro* de extractos de estas células, es decir, los productos de las reacciones de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 se detectaron en forma de ácidos grasos libres. La 'potenciación' de los productos ácidos grasos libres de la actividad de la PUFA sintasa *in vitro* formaba la base del ensayo desarrollado para la identificación de los factores EF-X. Los perfiles de ácidos grasos de las cepas de *E. coli* en los que las proteínas Sz-TE2 y Sz-TE3 se coexpresaban, separadamente o juntas, junto con el sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888, también se determinaron. Se transformó *E. coli* cepa JK824 (que expresan subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI) con el vector pCOLA™ duet que contenía Sz-TE2 (TE2) o Sz-TE3 (TE3) o ambos, Sz-TE2 + Sz-TE3 (TE2+TE3). Se cultivaron transformantes verificados a 32°C en medio 765 complementado con glicerol al 10% (p/v) (Hauvermale et al., Lipids 41:739-747, 2008). Las células se recolectaron 20 h después de la inducción con IPTG, se lavaron con Tris 50 mM, pH 7,5, se liofilizaron y los ácidos grasos se convirtieron en FAME y se analizaron mediante CG. Se muestran los resultados en las tablas a continuación.

Tabla II-A

Ácido graso	JK824	TE2 JK1350	TE2 JK1351	TE3 JK1346	TE3 JK1347	TE2+3 JK1349	TE2+3 JK1348
C120*	5,6	5,4	5,4	5,0	5,8	4,5	5,2
C14:0*	3,6	3,8	4,1	3,3	4,2	3,1	3,8
C16:0*	17,8	18,2	20,5	17,1	19,5	15,6	17,5
C16:1*	8,1	9,4	6,2	7,5	7,3	7,5	6,2
Desconocido 1	6,0	6,1	6,9	6,2	6,8	5,3	6,3
C18:1 N7	26,6	26,8	23,6	26,1	24,2	23,2	20,9
Desconocido 3	5,1	4,3	7,3	6,6	5,2	5,0	5,3
Desconocido 4	7,8	7,2	8,0	7,6	8,0	7,0	7,5
C22:5 N6*	4,6	5,0	3,4	4,9	4,0	6,4	5,7
C22:6 N3*	90	8,7	8,4	9,6	8,8	17,4	15,9
DHA + DPA n6	13,6	13,7	11,8	14,5	12,8	23,9	21,5
DHA/DPA n6	2,0	1,7	2,5	2,0	2,2	2,7	2,8

La Tabla II-A muestra los perfiles de ácidos grasos - como % de los FAME totales: de *E. coli* cepa JK824 (que expresa subunidades de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI) y de las cepas que expresan Sz-TE2 (TE2) o Sz-TE3 (TE3) o ambos (TE2+3) en el fondo de JK824. Sólo se muestran los ácidos grasos con niveles >1% de los FAME totales.

Tabla II-B

		TE2	TE2	TE3	TE3	TE2+3	TE2+3
Ácido graso	JK824	JK1350	JK1351	JK1346	JK1347	JK1349	JK1348
C12:0*	3,0	3,0	27	28	31	2,7	32
C14:0*	1,9	2,1	2,1	1,9	2,3	1,9	2,3
C16:0*	9,5	10,0	10,4	9,6	10,5	9,4	10,7
C16:1*	4,3	5,2	3,1	4,2	39	4,5	3,8
Desconocido 1	3,2	3,4	3,5	3,5	3,7	3,1	3,8
C18:1 N7	14,2	14,7	11,9	14,7	13,0	13,9	12,7
Desconocido 3	2,7	2,4	3,7	3,7	2,8	3,0	3,2
Desconocido 4	4,2	4,0	4,0	4,2	4,3	4,2	4,6
C22:5 N6*	2,5	2,8	1,7	2,8	2,2	3,9	3,5
C22:6 N3*	4,8	4,8	4,2	5,4	4,7	10,5	9,1
Suma de FAME	53,2	55,0	50,4	56,1	53,9	60,0	60,9
DHA + DPAn6	7,3	7,5	5,9	8,2	6,9	14,4	13,1

La Tabla II-B muestra los perfiles de ácidos grasos - como mg de FAME/gramo de biomasa seca - de las cepas de *E. coli* mostradas en la Tabla II-A. Sólo se muestran aquellos ácidos grasos incluidos en la Tabla II-A.

Los datos en la Tabla II-A indican que la coexpresión de Sz-TE2 o Sz-TE3 por sí solas con el sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 en *E. coli* no altera significativamente los perfiles de ácidos grasos (como % de los FAME totales) respecto a la cepa parental (JK824). En contraste, la expresión de Sz-TE2 y Sz-TE3 juntos resulta en un incremento de aproximadamente dos veces de la cantidad de DHA en dichas células. Resulta interesante que también se produce un incremento de la cantidad de DPAn-6, aunque es inferior que para DHA, resultando en un incremento de la proporción de DHA a DPAn-6 de -2,0:1 a ~2,7:1. Esta proporción más elevada es más próxima a la observada típicamente en aceite procedente de *Schizochytrium* 20888 mismo.

Los datos mostrados en la Tabla II-B indican que el incremento del % de PUFA observado al expresar tanto Sz-TE2 como Sz-TE3 se ve acompañado de un incremento de la acumulación de los mg totales de FAME por gramo de biomasa. Además, ese incremento está específicamente asociado a un incremento de los mg de DHA y DPAn-6, mientras que las cantidades de otros ácidos grasos se mantienen relativamente sin modificación. Los análisis anteriores indican que los productos de la PUFA sintasa se acumulan como ácidos grasos libres en *E. coli*, y es probable que también se encuentren presentes PUFA adicionales en dichas células como ácidos grasos libres y no incorporados en las membranas celulares.

#### Ejemplo 9

El ejemplo a continuación describe el efecto sobre los perfiles de ácidos grasos de la coexpresión de Sz-TE2 y Sz-TE3 en levaduras que expresan la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 y HetI. Los datos indican que la acumulación de los productos de la PUFA sintasa (DHA y DPAn-6) pueden incrementarse mediante la coexpresión de Sz-TE2 y Sz-TE3. Indican además que Sz-TE3 presenta algo de actividad al expresarse sin Sz-TE2.

*Clonación de los Orf de Sz-TE2 y Sz-TE3 en vectores de expresión levaduras:* la expresión de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 (PFA 1, 2 y 3) junto con HetI en levaduras resulta en la acumulación de DHA y DPAn-6 en dichas células (Metz et al., solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599). Una de las cepas creadas para expresar este sistema contenía los genes en los vectores siguientes: PFA1 en un vector pYES-Leu (los codones de Orf se modificaron para la expresión en levaduras), PFA2 en un vector pYES3-Tryp (los codones de Orf se modificaron para la expresión en levaduras) y PFA3 y HetI en un vector pESC-Ura (las secuencias de Orf nativas se utilizaron para ambos genes). Para someter a ensayo los efectos de la coexpresión de los candidatos de factor potenciador con PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 - las regiones codificantes de Sz-TE2 y Sz-TE3 se clonaron en un vector pESC-His, separadamente o juntos. Sz-TE2 se clonó detrás del promotor Gal 1 (como fragmento BamHI - XhoI), mientras que Sz-TE3 se clonó detrás del promotor Gal 10 (como fragmento EcoRI - NotI). Ambos fragmentos de ADN conservaban las secuencias de nucleótido de Orf nativo.

*Perfiles de FAME de las cepas de levadura que expresan el sistema de PUFA sintasa de Schizochytrium 20888 y Sz-TE2 y Sz-TE3:* las cepas de levadura que expresan la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 activa (genes de subunidades más HetI) sola o que contienen además Sz-TE2 o Sz-TE3, solas o juntas, se cultivaron en medio apropiado. La expresión de los transgenes se indujo mediante resuspensión de las células lavadas en medio que

5 contenía galactosa. Las células se cultivaron durante 20 h a 30°C tras la inducción y después se recolectaron mediante centrifugación, se liofilizaron y sus ácidos grasos se convirtieron en FAME utilizando metanol ácido y se analizaron mediante CG. Los perfiles de FAME de las diversas cepas se muestran en la Tabla III (como % de los FAME totales). La cepa de control (con solo genes de PUFA sintasa más HetI) produjeron DHA y DPAn-6 a niveles consistentes con las observaciones anteriores (Metz et al., solicitud publicada de patente US nº 2013-0150599), es decir, 2,9% de DHA y 1,8 o 1,9% de DPAn-6. La coexpresión de Sz-TE2 por sí solo no incrementó los niveles de PUFA. La coexpresión de Sz-TE3 por sí solo resultó en un incremento ~1,5x de la acumulación de PUFA pero no alteró la proporción de DHA a DPAn-6. La coexpresión de Sz-TE2 y Sz-TE3 juntos resultó en incremento ~1,6x de la acumulación de PUFA con un incremento de ~1,9x del nivel de DHA. Además, la proporción de DHA a DPAn-6 en las células que coexpresaban Sz-TE2 y Sz-TE3 se incrementó de ~1,5 a ~2,7. Tal como en el caso de la expresión en *E. coli*, Sz-TE2 por sí mismo no resultó en un incremento de la acumulación de PUFA. En contraste con el resultado en *E. coli*, Sz-TE3 por sí mismo sí resultó en la acumulación de tanto DHA como DPAn-6 en levaduras. La aparente falta de solubilidad de Sz-TE3 (al expresarla sin Sz-TE2) en *E. coli* podría explicar el diferente resultado obtenido respecto a las levaduras. Resulta evidente que el resultado puede verse afectado por el huésped heterólogo utilizado para la expresión. El incremento de la proporción de DHA:DPAn-6 nuevamente se observa al expresar ambos, tanto Sz-TE2 como Sz-TE3 (de ~1,5 a ~2,7).

Tabla III

% de FAME	24hrs							
			TE2	TE2	TE3	TE3	TE2+3	TE2+3
	BRY4.11 -3	BRY4.11 -4	YIWR1-3	YMR1-4	YMR2-3	YMR2-4	YMR3-3	YMR3-4
Ácido graso								
C12:0*	17	1,6	2,1	23	1,8	1,9	2,1	2,1
C14:0*	14	1,3	1,7	18	1,3	1,3	1,6	1,6
C14:1*	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,4	0,4	0,5
C16:0*	17,5	17,1	19,0	18,9	18,3	18,5	18,5	18,3
C16:1*	41,5	41,4	43,5	45,7	39,7	40,4	40,8	41,8
C18:0*	6,1	6,1	5,8	5,2	6,1	6,0	5,6	5,2
C18:1 N9*	25,1	25,5	22,8	21,9	23,2	22,9	21,9	21,4
C18:1 N7	10	1,0	0,9	0,8	0,9	0,8	0,7	0,7
C22:5 N6*	1,9	1,8	1,2	0,9	2,6	2,7	2,0	2,1
C22:6 N3*	2,9	2,9	1,9	16	4,8	4,1	5,5	5,6
DHA+DPAn6	4,7	4,7	3,1	23	7,4	6,8	7,5	7,7
DHA/DPAn6	1,5	1,6	1,6	1,8	1,8	1,5	2,7	2,7

20 La Tabla III muestra los perfiles de ácidos grasos - como % de los FAME totales - de las cepas de levadura de control (BRY4.11 - que expresan la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888, PFA 1, 2 y 3, y HetI) y cepas que expresan Sz-TE2 o Sz-TE3 o ambos en el fondo parental (BRY4.11). Sólo se muestran los ácidos grasos con niveles >1% de los FAME totales.

25 Ejemplo 10

El presente ejemplo demuestra que los homólogos de Sz-TE2 y Sz-TE3 pueden identificarse fácilmente en otro traustozitridio que utiliza una PUFA sintasa.

30 *Schizochytrium* 9695 contiene una PUFA sintasa homóloga respecto a la observada en *Schizochytrium* 20888 (Apt et al., solicitud publicada de patente US nº 2010-0266564). Se generó un borrador de secuencia de genoma completo de este organismo y se ensambló en contigs. Se llevó a cabo una búsqueda en BLAST traducido (tblastn) frente a una base de datos que contenía todos los contig ensamblados utilizando las secuencias de aminoácidos de Sz-TE2 y Sz-TE3 como preguntas. En ambos casos sólo se identificaron 2 contig con homología significativa respecto a las secuencias de pregunta - y eran los mismos contig en ambos casos (en orden inverso). Se identificaron los marcos de lectura abiertos apropiados y se listan las secuencias de nucleótidos y sus traducciones predichas. El homólogo de aminoácidos de Sz-TE2 se denomina B-TE2, el homólogo de aminoácidos de Sz-TE3 se denomina B-TE3. Las secuencias de nucleótidos de estos dos Orf junto con las traducciones predichas se muestran en el Listado de secuencias y se describen posteriormente.

35 *Secuencia de nucleótidos codificante de B-TE2 y traducción predicha:* la secuencia de nucleótidos del Orf predicho contenía 468 pb (sin el codón de parada) y la traducción codificaba una proteína de 17,36 kDa con 156 aminoácidos.

40 *Secuencia de nucleótidos codificante de B-TE3 y traducción predicha:* la secuencia de nucleótidos del Orf predicho contenía 963 pb (sin el codón de parada) y la traducción codificaba una proteína de 36,5 kDa con 321 aminoácidos.

Alineación de las secuencias de aminoácidos de Sz-TE2 y Sz-TE3 con los homólogos de B-TE: la figura 3A muestra la alineación de Sz-TE2 respecto a B-TE2. Se muestran los residuos idénticos en esta alineación en gris pálido y los cambios conservadores en gris más oscuro, respectivamente. Utilizando Sz-TE2 como la referencia, 52 de 137 aminoácidos eran idénticos (38,0%) y había 78 de 137 positivos (idénticos más cambios conservadores) (56,9%). La secuencia de B-TE2 presenta una región adicional rica en serinas y glicinas en la parte intermedia de la proteína (mostrada como un hueco en la alineación).

La figura 3B muestra la alineación de Sz-TE3 respecto a B-TE3. Tanto Sz-TE3 como B-TE3 contienen 321 aminoácidos. En esta alineación, 155 de 321 aminoácidos son idénticos (48,3%) y existen 192 de 321 positivos (59,8%). Tal como en el caso de B-TE2, la secuencia de B-TE3 presenta una región adicional rica en serinas y glicinas en la parte intermedia de la proteína (mostrada como un hueco en la alineación).

#### Ejemplo 11

El presente ejemplo demuestra que B-TE2 y B-TE3 pueden potenciar la actividad de la PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888 en un ensayo *in vitro*. Sugiere que los EF-X podrían desempeñar una función general en la potenciación de las actividades de PUFA sintasa.

**Construcción de plásmidos de expresión en *E. coli* que contienen Orf de B-TE2 y B-TE3:** se utilizó la misma estrategia básica para la clonación de Sz-TE2 y Sz-TE3 para los homólogos de B-TE. Las Orf codificantes de B-TE2 y B-TE3 se clonaron separadamente y juntas en dos vectores Novagen Duet: pETDuet™ (portador del marcador de resistencia Amp) y pCOLADuet™ (portador del marcador de resistencia Kan). En ambos casos, se clonó Orf de B-TE2 en MCS-1 y B-TE3 se clonó en MCS-2. Los Orf finales para ambos genes en los constructos eran idénticos a los Orf nativos listados anteriormente.

**Expresión de B-TE2 y B-TE3 en *E. coli* - ensayos de solubilidad de proteínas:** La misma estrategia utilizada para evaluar la solubilidad de las proteínas Sz-TE2 y Sz-TE3 para los homólogos de B-TE. Las células que contienen plásmidos con B-TE2 y B-TE3, separadamente o juntos, se cultivaron en medio LB a 32°C. La síntesis de las proteínas se indujo mediante adición de IPTG (0,5 mM) y se continuó la incubación durante 3 a 5 h. Las células se recolectaron mediante centrifugación y se utilizó el reactivo Novagen "BugBuster®" (y protocolo de centrifugación) para separar las proteínas solubles de los residuos celulares y las proteínas no solubles (presumiblemente secuestradas en cuerpos de inclusión). Las muestras de células completas y las fracciones solubles y no solubles se trataron con SDS y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las bandas asociadas a B-TE2 y B-TE3 se detectaron fácilmente en los extractos de células completas, en donde B-TE3 se expresaba a nivel muy elevado. La comparación de las proteínas en las fracciones soluble y no soluble revela que B-TE2, al expresarse solo, se reparte principalmente en la fracción soluble. En contraste, B-TE3 permanece principalmente en las fracciones insolubles. Al coexpresar B-TE2 y B-TE3 en la misma cepa, la mayor parte de ambas proteínas se encuentran en las fracciones insolubles, pero puede detectarse una cantidad menor de ambos en las fracciones solubles. Estos resultados son similares a los observados para Sz-TE2 y Sz-TE3 - aunque la insolubilidad de B-TE3 es más pronunciada. Tal como en el caso de Sz-TE2 y Sz-TE3, estos datos sugieren una interacción entre las proteínas B-TE2 y B-TE3 que puede incrementar la solubilidad de B-TE3 en el sistema de *E. coli*.

**Ensayos de potenciación *in vitro* de la actividad: adición de B-TE2 y B-TE3 expresados por separado al sistema de PUFA sintasa de *Schizochytrium* 20888:** se sometieron a ensayo alícuotas de los homogenados celulares y fracciones de sobrenadante de las cepas de *E. coli* indicadas anteriormente en el ensayo de actividad *in vitro* de PUFA sintasa. Los extractos se mezclaron con un homogenado de *E. coli* cepa JK824 (que expresa Pfa 1, 2 y 3 de *Schizochytrium* 20888 más HetI) y el ensayo se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Respecto a los ensayos de Sz-TE2 y Sz-TE3, los homogenados y fracciones de sobrenadante se diluyeron 6X en tampón K antes de agruparse con el homogenado preparado por separado de JK824 en el ensayo de potenciación (ver el Ejemplo 5, anteriormente, para más información). La figura 4 muestra los resultados de estos ensayos de actividad junto con los ensayos de control (adición de solo tampón y adición de Sz-TE2 y Sz-TE3 expresados en *E. coli*). En la figura 4, "B" se refiere a *Schizochytrium* 9695. "Sz" se refiere a *Schizochytrium* 20888. "2" se refiere a TE2. "3" se refiere a TE3. "S" se refiere a fracción de sobrenadante. "H" se refiere a fracción de homogenado. Los datos en la figura muestran que B-TE2 y B-TE3, al expresarse juntos en *E. coli*, pueden potenciar significativamente la actividad *in vitro* de la PUF sintasa de *Schizochytrium* 20888. Este efecto resulta más evidente al utilizar el homogenado en el ensayo: la fracción de sobrenadante de dicha cepa era mucho menos activa. Además, los B-TE obtenidos de *Schizochytrium* 20888 y *Schizochytrium* 9695 pueden mezclarse, es decir, B-TE2 puede sustituir Sz-TE2 y B-TE3 puede sustituir Sz-TE3. Estos datos validan la selección de B-TE2 y B-TE3 como proteínas factores potenciadores.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP ASSETS B.V. METZ, James G. KUNER, Jerry M. McCASKILL, David G. FOSTER, Mendy L.

<120> FACTORES PARA LA PRODUCCIÓN Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFA) OBTENIDOS CON PUFA SINTASAS

<130> 29324-WO-PCT

<140> TBD

5 <141> 2015-01-28

<150> 61/932,310

<151> 2014-01-28

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 137

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp

<400> 1

Met Thr Ala Gln Gly Gly Tyr Arg Ser Glu Met Leu Met Tyr Tyr Glu  
 1 5 10 15

Asp Thr Asp Leu Thr Gly Ala Val Tyr Ala Gly Asn Tyr Phe Lys Tyr  
 20 25 30

Phe Glu Arg Ala Arg Asp Glu Ala Val Gly Ile Asp Val Leu Lys Thr  
 35 40 45

Leu Met Asp Lys Glu Gly Leu Ala Leu Tyr Val Arg Lys Met Gly Glu  
 50 55 60

Met Thr Phe Lys Gly Gly Ala Lys His Ala Asp Thr Leu Val Val Glu  
 65 70 75 80

Ser Ser Val Glu Ala Pro Ser Asp Phe Arg Leu Val Phe Lys Gln Arg  
 85 90 95

Ala Ser Val Lys Asp Arg Pro Glu Thr Ile Ile Val Glu Thr Asp Val  
 100 105 110

Glu Val Val Cys Ile Asp Met Lys Thr Gln Arg Val Ala Lys Ile Pro  
 115 120 125

20 Thr Gln Ile Arg Glu Ala Leu Arg Ile

130 135

<210> 2

25 <211> 321

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp

ES 2 721 269 T3

<400> 2

Met Ala Ala Pro Ser Thr Ala Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Leu Asp  
1 5 10 15

Glu Ala Pro Leu Lys Val Ser Arg Ala Arg Gly Tyr Asp Ala Leu Asp  
20 25 30

Val Lys Val Tyr Arg Glu Asp Thr Asp Thr Val Gly Ile Val Phe Tyr  
35 40 45

Arg Asn Phe Leu Thr Trp Phe Glu Arg Gly Arg Glu Asn Ala Ile Ser  
50 55 60

Thr Asp Phe Leu Ala Gly Leu Phe Glu Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Val  
65 70 75 80

Val Thr Arg Ser Glu Gln Ser Phe Arg Lys Pro Ala Phe Tyr Gly Asp  
85 90 95

Glu Leu Glu Val Arg Thr Ile Pro Phe Ala Asp Gly Pro Phe Arg Leu  
100 105 110

His Phe Asp Gln Ser Ile Trp Arg Lys Ser Asp Asn Thr Leu Leu Val  
115 120 125

Ala Gly Phe Val Glu Met Val Thr Val Ser Arg Thr Phe Gln Leu Thr  
130 135 140

Lys Val Pro Gln Pro Val His Asp Leu Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Cys  
145 150 155 160

Lys Ser Asn Phe Thr Tyr Cys Glu Lys Pro Gly Ala Lys Lys Arg Pro  
165 170 175

Leu Arg Arg Lys Pro Gly Ala Pro Ser Ser Leu Gly Lys Thr Thr Glu  
180 185 190

Leu Asp Leu Val Ile His Leu Ala Asp Thr Asp Phe Thr Gly Ile Ala  
195 200 205

Phe His Pro Asn Tyr Tyr Cys Trp Phe Glu Arg Ala Arg Ser Asp Phe

ES 2 721 269 T3

210

215

220

Leu Ser Asn Glu Ile Leu Ala Arg Ala Lys Thr Glu Phe His Ala Val  
225 230 235 240

Pro Val Val Arg Ser Ala Lys Leu Ala Tyr Lys Asn Gly Ala Arg Pro  
245 250 255

Val Glu Pro Leu Arg Ile Thr Thr Thr Gln Asp Pro Lys Gly Glu His  
260 265 270

Ser Asp Phe Val Val Pro Ile Leu Gln Lys Leu Thr Arg Val Ser Asn  
275 280 285

Asp Gln Thr Leu Val Glu Ala Val Phe Glu Met Cys Phe Val His Asp  
290 295 300

Lys Glu Arg His Leu Val Lys Val Pro Ser Ile Val Arg Asp Ala Ile  
305 310 315 320

Ala

<210> 3

<211> 156

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp

<400> 3

Met Val Met Val Ala Glu Glu Lys Arg Ala His Glu Val Ala Val Gln  
1 5 10 15

Leu Tyr Tyr Glu Asp Thr Asp Phe Ser Gly Phe Val His His Ala Asn  
20 25 30

Phe Leu Arg Tyr Phe Glu Arg Gly Arg Asp Glu Met Ile Gly Leu Pro  
35 40 45

Val Leu Lys Cys Leu Ala Gln Asp Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
50 55 60

Thr Ser Ile Gly Gly Gly Glu Pro Pro Val Ser Leu Phe Val His Lys  
65 70 75 80

Val His Glu Leu Ser Phe Lys Gly Arg Ala Arg His Gly Glu Met Leu  
85 90 95

10 Val Val Arg Ser Arg Val Val Lys Glu Ser Asp Phe Arg Leu Arg Phe

ES 2 721 269 T3

100

105

110

Ala His Glu Ala Trp Val Gly Asn Thr Leu Val Ala Ser Gly Ser Met  
115 120 125

Asp Val Val Phe Leu Cys Gly Ser Val Asp Ala Arg Leu Val Lys Ile  
130 135 140

Pro Asn Ser Val Asp Val Ala Leu His Gly Tyr Tyr  
145 150 155

<210> 4

5 <211> 321

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp

<400> 4

Met Arg Ile Asp Glu Glu Ala Ile Arg Val Ala Ala Ala Arg Gly Tyr  
1 5 10 15

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

Ile Val Phe Tyr Arg His Tyr Leu Ala Trp Phe Glu Arg Gly Arg Glu  
35 40 45

Asn Val Ile Ser Val Gln Phe Leu Ala Asp Leu Phe Arg Glu Thr Gly  
50 55 60

Glu Ser Phe Val Val Thr Arg Ser Glu Gln Val Phe Lys Arg Ser Ala  
65 70 75 80

Arg Tyr Gly Asp Gln Leu Glu Val Arg Thr Ile Pro Phe Leu Asp Gly  
85 90 95

Asp Tyr Arg Leu Gly Phe Asp Gln Ser Val Trp His Gly Asn Glu Met  
100 105 110

Leu Val His Gly Phe Val Glu Met Val Cys Val Ser Lys Ser Phe Gln  
115 120 125

Leu Ala Gln Gln Pro Ala Leu Val Arg Lys Leu Ile Gly Cys Phe Asp  
130 135 140

Glu Cys Thr Arg Asn Phe Thr Tyr Val Gly Thr Lys Ala Arg Met Pro  
145 150 155 160

10 Gln Thr Ile Arg Arg Arg Arg Gly Thr Ala Ser Leu Pro Gln Ala Gln



ES 2 721 269 T3

<400> 6  
atggctgcgc catcgactgc agtctgcggc gagctgcca agctcgacga ggcgcctctc 60  
aaggtgtctc gtgcacgtgg ctacgacgcg ctcgacgtca aggtgtacag agaggacaca 120  
gacacagtag ggatcgtggt ctatcgtaac tttttgacct ggtttgagcg tggccgggaa 180  
aacgcgatct ccacagactt tctcgcagga ctgttcgagt acagtgggta ctccctcgtg 240  
gtcacgcggt ccgagcagtc gtttcgcaag cctgcatttt acggcgatga actcgaagtc 300  
cgaaccattc cttttgcaga tgggcccttt cgcctgcact ttgaccagag catctggcga 360  
aagagcgaca acacattgct agtcgctggc tttgtagaga tggtcacggt gagcagaact 420  
tttcagctca ccaaggtacc tcagccggtg cagcacctca tttattactt tgacgattgc 480  
aagtcgaact tcacctactg cgaaaagccc ggcgccaaga aaaggccgct tcggcgtaag 540  
cccggggcgc cctcttcact tggcaaaacc acagagcttg acctggcat tcacttgccc 600  
gacactgact ttactggaat cgcattccac cccaactact actggttggt cgagcgtgcg 660  
cgctcggatt ttctcagcaa tgagattctt gcacgcgcca agaccgagtt tcatgctggt 720  
cccgttgtgc gcagtgcaaa actcgcgtac aaaaacggcg cgaggcctgt tgagccgctc 780  
cgcattacaa cgacgcaaga tccgaagggc gagcactcgg actttgtcgt accgattctt 840  
caaaagctta cgcgtgtctc gaacgaccag acgctcgtcg aagccgtctt tgagatgtgc 900  
tttgttcatg acaaggagcg ccacctcgtc aaggtcccgt cgatcgctcg cgatgctatt 960  
gcg 963

5 <210> 7  
<211> 468  
<212> ADN  
<213> Schizochytrium sp

<400> 7  
atggctcatgg tcgcggagga gaagagggcg cagcaggtgg cagtacagtt gtactatgag 60  
gacacggact tctccggctt tgtccatcat gccaaacttc tgcgctactt tgaacgcggc 120  
cgggatgaga tgattggcct gcccgttctc aaatgcttgg cccaagacga tagctcttct 180  
tcttcttctg caacttcaat tgggtgggtggc gagcctccag tatcattggt cgtgcataag 240  
gtgcacgagt tgtcgttcaa aggtcgcgct cggcacggtg agatgctcgt ggtgcggtca 300  
cgagtggca aggaatcgga cttccgactg cgctttgcac acgaagcgtg ggtggggaac 360  
acgctcgtgg cctctggatc aatggacgtg gtgttcctgt gtggctcggc cgatgcgcga 420  
10 ttagtgaaga tccctaactc ggtcgatgtg gccttgacag gatactat 468

15 <210> 8  
<211> 963  
<212> ADN  
<213> Schizochytrium sp

ES 2 721 269 T3

<400> 8  
atgagaatcg acgaggaggc gatacgcgtg gcagcggcgc gcgggtacga cgccttgccc 60  
gtgacagtgt atcgagagtt taccgactgc ctgggcattg tgttctaccg gcactaccta 120  
gcgtggtttg agcgcgggcg cgagaacgtc atctcgggtgc agttcttggc ggatctgttt 180  
cgcgaaaacgg gggagtcggt cgtggtgacg cgctccgagc aagtgtttaa gcgctcagcg 240  
cgctatggcg accaactcga agtgcgcacc attcctttcc tggacggcga ctaccgcctc 300  
ggcttcgacc agagcgtgtg gcacggcaat gagatgctcg tgcattggctt cgtggagatg 360  
gtctgcgtaa gcaagagctt ccagctggcg caacaaccgg cgctcgtgcg caagctgatc 420  
ggctgctttg acgagtgcac gcgcaacttc acctacgtcg gcaccaaggc ccgcatgccc 480  
caaaccattc gacgacgcag aggcacggcc agtctaccac aagcacagaa gcctctagtg 540  
tttgacgggc tgcacttgca ccaagcggac acagacttca caggtatcac ttttcacccc 600  
aactactact gctactttga acgcgcgcgc tcgcaggcat tgactcccgc cgtattagcg 660  
aacgtggctg agttcgcaa cgctgtgcca gtcattccgc aagcccgcac gaccttcaag 720  
caaggcgcga gagcgtacga gacactccgc gtgctcacat caattgctct ggatgatagc 780  
ggcggcagca gcagcagcag caacaagtat gtcgtgccgt ttgagcaggc gctcgtgcga 840  
agagaagacg acaaggtgct ggtggaggcg cgaatcgaga ttgtctttgt ggaccagact 900  
acgaagttgc cctgcccgat tctgacgca gtggcagcca agatgcagga gttgtttgcg 960  
5 gta 963

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que es por lo menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3, en la que el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUFA sintasa.
2. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido es por lo menos 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3.
- 10 3. Molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido que es por lo menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4, en la que el polipéptido potencia la actividad enzimática de una PUFA sintasa.
- 15 4. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 3, en la que dicho polipéptido es por lo menos 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.
- 20 5. Célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula huésped es un microorganismo traustoquiritrial o una bacteria.
- 25 6. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 5, en el que el organismo expresa endógenamente un sistema de PUFA sintasa, una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y/o una acil-CoA sintetasa (ACS).
- 30 7. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 6, en el que el organismo ha sido modificado genéticamente adicionalmente para expresar endógenamente un sistema de PUFA sintasa, una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y/o una acil-CoA sintetasa (ACS).
- 35 8. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 7, en el que el sistema de PUFA sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de un sistema de PUFA sintasa de un microorganismo traustoquiritrial o en el que la PUFA sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de una PUFA sintasa de una bacteria marina.
9. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 8, en el que el sistema de PUFA sintasa comprende por lo menos un dominio funcional de un sistema de PUFA sintasa de un *Schizochytrium*.
- 40 10. Microorganismo modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el microorganismo modificado genéticamente comprende DHA, DPAn-6 y/o EPA.
- 45 11. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 10, en el que la cantidad de DHA, DPAn-6 y/o EPA producido en dicho microorganismo modificado genéticamente es superior a la producida en el microorganismo correspondiente en el que no se expresa ninguna de las moléculas de ácido nucleico recombinantes según las reivindicaciones 1 a 4.
- 50 12. Microorganismo modificado genéticamente según la reivindicación 11, en el que la proporción DHA:DPAn-6 producido en dicho microorganismo modificado genéticamente es superior a la producida en el microorganismo correspondiente en el que no se expresa ninguna de las moléculas de ácido nucleico recombinantes según las reivindicaciones 1 a 4.

FIG. 1

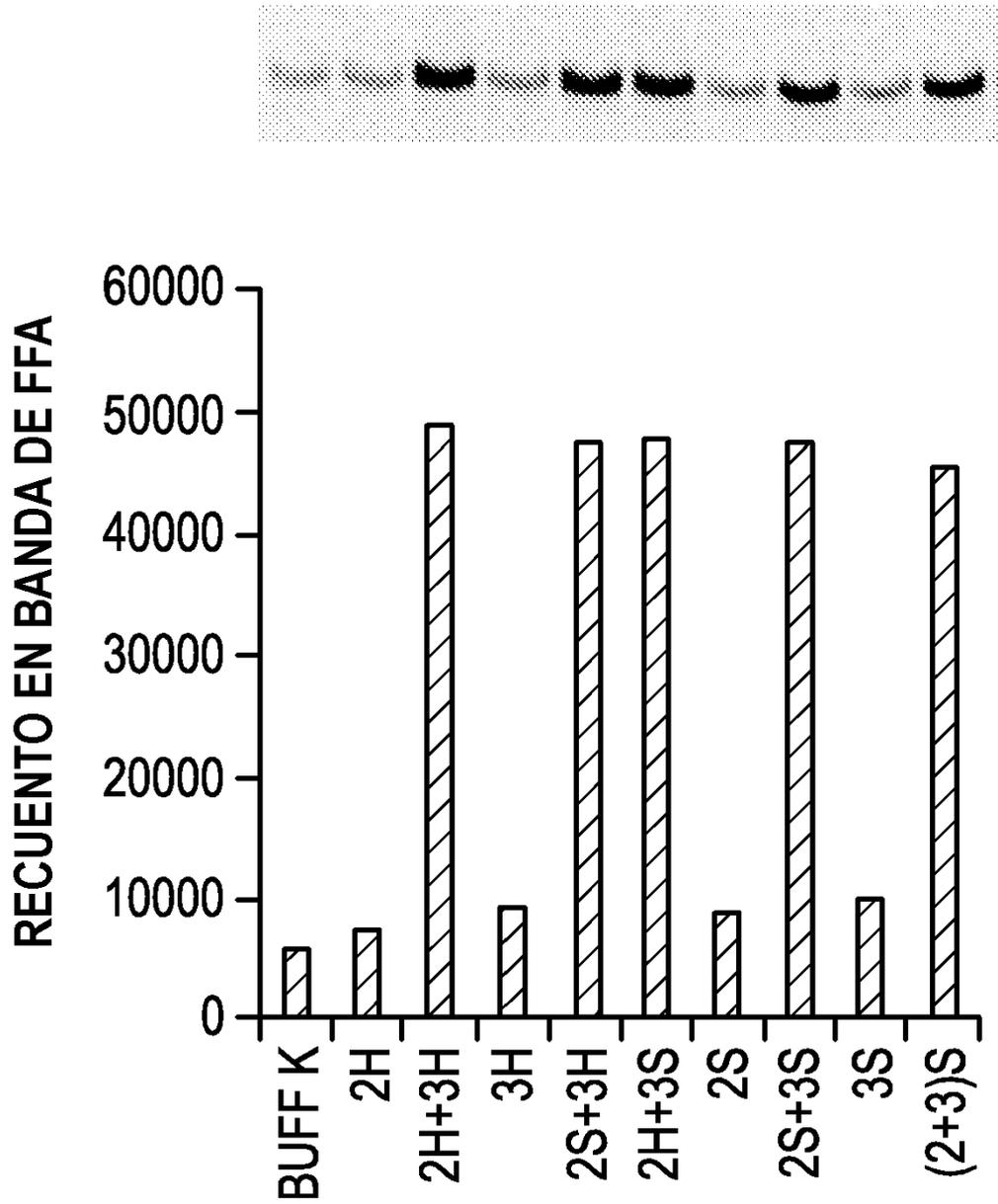


FIG. 2

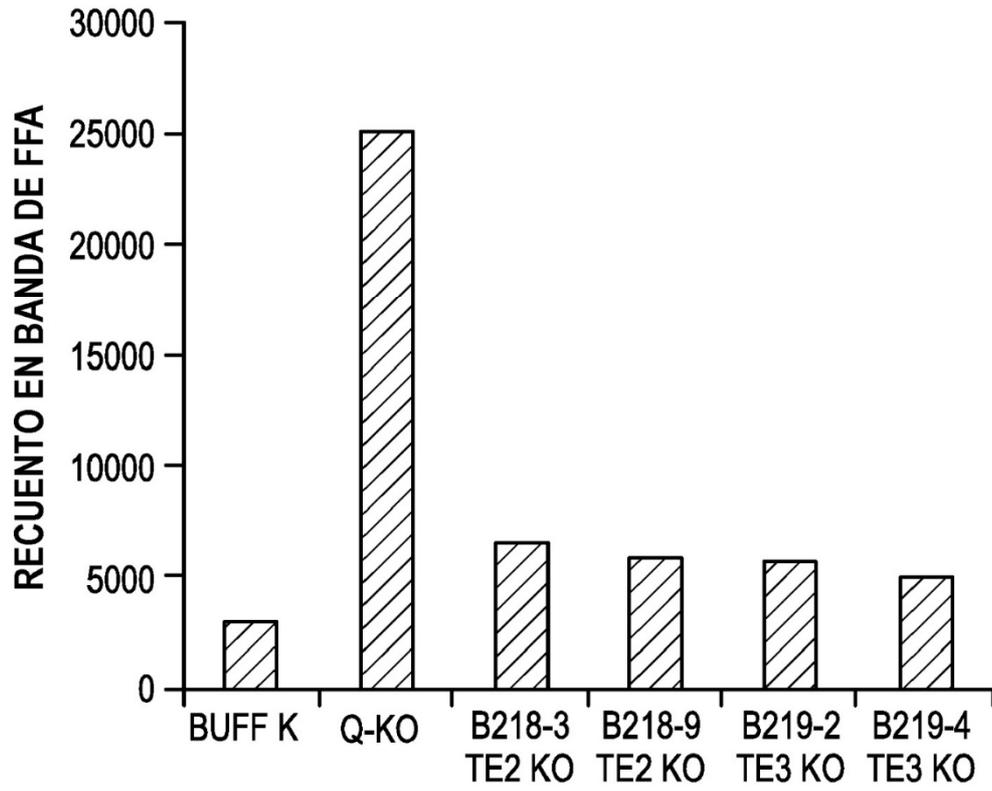




FIG. 3B

(1)	1	10	20	30	40	50	60	79
B_TE3 (1)	-----MRIDEEAIRVAARGYDALPVTVYREFTDCLGIVFYRHYLAWFERGRENVISVQFLADLFRETGESEF							
SzTE3 (1)	MAAPSTAVCGELPKLDEAPLKVSRAAGYDALDKVYREDTDTVIGIVFYRNFLTWFERGRENAISTDFLAGLFEYSGDSEF							
(80)	80	90	100	110	120	130	140	158
Section 2								
B_TE3 (68)	VVTRSEQVFKRSARYGDQLEVRTIPEFLDGDYRLGFDQS <del>WHG</del> --NEMLVHGFVEMVCVSKSFQLAQQPALVRKLI <del>GC</del> FD							
SzTE3 (80)	VVTRSEQSFRKPAFYGDELEVRTIPEFADGPFRLHF <del>DS</del> QSIWRKSDNTLLVAGFVEMVTVSRTFQLTKVPQPVHDLIYYFD							
(159)	159	170	180	190	200	210	220	237
Section 3								
B_TE3 (145)	E <del>CT</del> RNFTYVGTKARMPQTI <del>RRRR</del> GTASLPQAQKPLVFDGLHLHQADTFTGITHFNPYYCYFERARSQALTPAVLANVA							
SzTE3 (159)	DCKSNFTYCEKPGAKRRP <del>LR</del> K---PGAPSSLGKTT <del>EL</del> DLV <del>IHL</del> ADTFTGIA <del>FHP</del> NPYYCWFERARSD <del>FL</del> SNEILARAK							
(238)	238	250	260	270	280	290	300	316
Section 4								
B_TE3 (224)	EFANAVPVI <del>RQ</del> ARMTFKQGARAYETLRVLTSLALDSDSGSSSSSNKYVVPFEQVLVRR <del>ED</del> DKVLVEARIEIVFVDQ <del>TT</del> K							
SzTE3 (235)	TEFHAVPV <del>RS</del> AKLAYKNGARPVEPLRITTTQDPKGE-----HSDFFVPIQLKLRVSN <del>DQ</del> TLVEAVFEMC <del>FV</del> HDKER							
(317)	317	335						
Section 5								
B_TE3 (303)	LPCPI <del>PD</del> AVAAKMQELFAV							
SzTE3 (308)	HLVKVPSIVRDAIA-----							

FIG. 4

