

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035512**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/64* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)

(21) Номер заявки
201691550

(22) Дата подачи заявки
2015.01.29

(54) **ПРОМОТОРЫ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В ДРОЖЖАХ**

(31) **61/933,979**

(32) **2014.01.31**

(33) **US**

(43) **2016.11.30**

(86) **PCT/US2015/013453**

(87) **WO 2015/116781 2015.08.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АСЕТС Б.В. (NL)

(56) DUJON, B. et al. *Yarrowia Lipolytica* CLIB122 Chromosome D Complete Sequence; obtained from the internet on 15 April 2015 at [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/49648093?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=JZWFZZTB016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/49648093?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=JZWFZZTB016)

US-A-6110703

WO-A2-2006102342

(72) Изобретатель:
**Мак Грэг Джессика Лей (US), Шеврё
Бастьен (DE), Йорги Питер Скотт
(US)**

(74) Представитель:
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)**

(57) Изобретение относится к применению новых промоторов для экспрессии гетерологичных генов, предпочтительно для экспрессии генов в организмах рода *Yarrowia*, к генетически модифицированным организмам рода *Yarrowia* и к способу получения биосинтетических продуктов культивированием генетически модифицированных организмов.

B1

035512

035512

B1

Перекрестные ссылки на имеющие отношение заявки

Заявка на данное изобретение претендует на все преимущества по дате подачи предварительной заявки на патент США серийный № 61/933 979, зарегистрированной 31 января 2014 г., раскрытие которой включено в настоящий документ путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к применению новых промоторов для экспрессии гетерологичных генов, предпочтительно для экспрессии генов в организмах рода *Yarrowia*, к генетически модифицированным организмам рода *Yarrowia* и к способу получения биосинтетических продуктов культивированием генетически модифицированных организмов.

Уровень техники

Различные биосинтетические продукты, например химические продукты тонкого органического синтеза, такие как, в числе прочего, аминокислоты, витамины, каротиноиды, но также и белки, получают в клетках с помощью природных метаболических способов и применяют в различных отраслях промышленности, включая такие отрасли, как производство продуктов питания для людей и кормов для животных, производство косметических и фармацевтических средств.

Производство таких изделий в больших масштабах происходит частично с помощью биотехнологических способов с применением микроорганизмов, которые разрабатывают для продукции и секретирования конкретного желаемого вещества в больших количествах.

Например, каротиноиды синтезируются *de novo* в бактериях, водорослях и грибах. В последние годы наблюдается постоянный рост попыток применить жиробразующие дрожжи и грибы в качестве организмов для производства продуктов тонкого органического синтеза, в особенности для получения витаминов и каротиноидов.

Каротиноиды, такие как лютеин, зеаксантин, астаксантин и бета-каротин, экстрагируют, например, из *Yarrowia* в виде так называемого олеорезина. Такие олеорезины применяются как в качестве компонентов биологически активных добавок, так и в секторе производства кормов.

Кетокаротиноиды, имеются в виду каротиноиды, которые включают по меньшей мере одну кетогруппу, такие как, например, астаксантин, кантаксантин, эхине нон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин и адониксантин, представляют собой природные антиоксиданты и пигменты, которые продуцируют некоторые водоросли, организмы и микроорганизмы в качестве вторичных метаболитов.

Биосинтез данных молекул в организмах, которые способны их производить, таких как дрожжи и бактерии, подробно охарактеризован (Weinheim et al., (1996), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Vol. A27, p. 443-613; Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons, Michal, G. Ed. (1999); Ong, A.S., Niki, E. and Packer, L., (1995), "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Rree Radical Research-Asia, held on Sep. 1-3, 1994, in Penang, Malaysia, AOCs Press, Champaign, IL X, 374 S). В особенности биосинтез каротиноидов в *Yarrowia* описан в WO 2006/102342.

Благодаря их красящим свойствам кетокаротиноиды, в особенности астаксантин, применяют в качестве пигментирующих средств при получении кормов для животноводства, в особенности для разведения форели, лосося и креветок.

Следовательно, экономичный биотехнологический способ получения природных биосинтетических продуктов, в особенности каротиноидов, имеет большое значение.

WO 2008/042338 раскрывает ряд промоторов, примененных для оверэкспрессии генов биосинтеза каротиноидов в *Yarrowia*.

Один тип промоторов раскрыт в EP 0220864 A. Данная публикация описывает промотор XPR2 дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Промотор XPR2 дрожжей активен только при pH среды, выше 6,0, в отсутствие предпочтительных источников углерода и азота, и для полной индукции ему необходимы высокие уровни пептона в культуральной среде (Ogrydziak, D.M., Demain, A.L., and Tannenbaum, S.R., (1977), Biochim. Biophys. Acta. 497:525-538.; Ogrydziak, D.M. and Scharf, S.J., (1982) Gen. Microbiol. 128:1225-1234).

Другой тип промоторов для экспрессии генов в дрожжах, таких как, например, *Yarrowia*, описан в WO 1997/044470.

Промоторы, применяемые до настоящего времени, не могут, однако, полностью удовлетворить потребность в высокой экспрессии в *Yarrowia*. Следовательно, существует потребность в обеспечении промоторов, которые лучше удовлетворяют данным требованиям.

Следовательно, цель настоящего изобретения заключается в обеспечении новых усовершенствованных промоторов дрожжей, в особенности для экспрессии с применением вектора для клонирования в дрожжах, но также для гетерологичной экспрессии желаемых продуктов тонкого органического синтеза, как определены выше, в выбранной системе экспрессии.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение направлено на рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, включающую а) полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 (называемой в настоящем документе HSP) или SEQ ID NO: 2 (называемой в настоящем документе HYP), или б) нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в жестких условиях, или с) функционально эквивалентные фрагменты последовательностей по пунктам а) или б).

В одном из аспектов изобретение направлено на рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, включающую полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В конкретном аспекте изобретения рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты функционирует в качестве промотора. Рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты применяют для регуляции экспрессии гена в дрожжах. В одном из воплощений дрожжи представляют собой организм рода *Yarrowia*. В одном из воплощений дрожжи представляют собой штамм *Yarrowia lipolytica*. В другом воплощении ген, который регулируют, гетерологичен организму рода *Yarrowia*.

В одном из воплощений рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с геномом, кодирующим белок. В воплощении ген функционально связан с одним или несколькими другими регуляторными сигналами. В конкретном воплощении функционально связанный ген выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих белок из а) биосинтетического пути органических кислот, или б) биосинтетического пути липидов и жирных кислот, или с) биосинтетического пути диолов, или д) биосинтетического пути ароматических соединений, или е) биосинтетического пути витаминов, или ф) биосинтетического пути каротиноидов, в особенности кетокаротиноидов.

В одном из воплощений рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, описанная в данном изобретении, представляют собой вектор.

Настоящее изобретение также относится к генетически модифицированному микроорганизму, включающему вышеописанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты. В одном из воплощений микроорганизм представляет собой члена рода *Yarrowia*. В другом воплощении вышеописанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты применяют для экспрессии одного или нескольких генов в микроорганизме-хозяине, в котором скорость экспрессии по меньшей мере одного или нескольких генов увеличивается по сравнению с диким типом. В конкретном воплощении регуляцию экспрессии гена в микроорганизме-хозяине достигают с помощью а) введения одной или нескольких из вышеописанных рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты в геном микроорганизма-хозяина, для того чтобы экспрессия одного или нескольких эндогенных генов микроорганизма-хозяина находилась под контролем введенной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты; б) введения одного или нескольких генов в геном микроорганизма-хозяина, для того чтобы экспрессия одного или нескольких введенных генов находилась под контролем вышеописанной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, которая эндогенна микроорганизму-хозяину; или с) введения одного или нескольких конструктов нуклеиновых кислот в микроорганизм-хозяин, в котором указанный один или несколько конструктов нуклеиновых кислот включают по меньшей мере одну из вышеописанных рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты и рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, функционально связанную с одним или несколькими генами, которые должны быть экспрессированы.

Настоящее изобретение также относится к способу получения биосинтетического продукта, включающему следующие стадии: а) культивирование генетически модифицированного микроорганизма рода *Yarrowia* в среде, в котором генетически модифицированный микроорганизм включает вышеописанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, в которой рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с геном, кодирующим белок; и б) получение биосинтетического продукта, созданного на стадии а). В некоторых воплощениях биосинтетический продукт секретируется в среду. В других воплощениях биосинтетический продукт накапливается внутри микроорганизма. В некоторых воплощениях биосинтетический продукт извлекают из изолированной микробной биомассы. В некоторых воплощениях биосинтетический продукт представляет собой каротиноиды.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 и 2 показывают средние уровни зеаксантина и астаксантина соответственно в виде площадей пиков HPLC, для двух протестированных промоторов в экспериментах со встряхиваемыми колбами (для зеаксантина: усредняли 10 трансформантов с промотором HSP и усредняли 5 трансформантов с промотором HYP. Для получения астаксантина: усредняли 12 трансформантов с промотором HSP и усредняли 12 трансформантов с промотором HYP).

Фиг. 3 показывает уровень экспрессии *ctfZ* от двух протестированных промоторов в ферментерах. Уровни изображены как количество полученного астаксантина, в виде площадей пиков HPLC, в различных проанализированных временных точках ферментации (ось у).

Фиг. 4 показывает уровень мРНК *ctfZ*, экспрессированной в ферментерах, по отношению к эндогенному гену, экспрессируемому строго конститутивно.

Фиг. 5 показывает единицы β-галактозидазы, продуцируемые шестью различными трансформантами, несущими ген *lacZ*, находящийся под контролем промоторов HSP и HYP соответственно.

Список последовательностей

Последовательности нуклеиновых кислот, перечисленные в прилагаемом списке последовательностей, показаны с помощью стандартного буквенного сокращения нуклеотидных оснований, как определено в 37 C.F.R. §1.822. Показана только одна цепочка каждой из последовательностей нуклеиновой кислоты, но понятно, что комплементарная цепь может быть включена с помощью любой отсылки к отображенной цепи. В прилагаемом перечне последовательностей:

SEQ ID NO:1 показывает промотор *HSP* из *Yarrowia lipolytica*.

tagtgaatc	acatgttct	actgtacctg	ctgtggacca	cgcacggcgg	aacgtaccgt
acaatattt	tcttctcac	atgactctct	ctcggccgcg	cacgccggtg	gcaaattgct
cttgcaattg	ctctgtctct	agacgtccaa	accgtccaaa	gtggcagggt	gacgtgatgc
gacgcacgaa	ggagatggcc	cgggtggcag	gaaccggaca	cggcgagccg	gctggaaaaa
aggcggaaaa	cgaaaagcga	agggcacaat	ctgacggtgc	ggctgccacc	aaccaagga
ggctatttg	ggctgcttc	catttccat	tcgccctcaa	tggccacttt	gctggtgga
acatggttc	tgaacaacc	ccccagaatt	agagtattt	gatgtgttta	agattgggtt
gctatttggc	cattgtgggg	gagggtagcg	acgtggaggga	cattccaggg	cgaattgagc
ctagaaagt	gtaccattcc	aaccgtctca	gtcgtccgaa	ttgatcgcta	taactatcac
ctctctcaca	tgttacttc	ccaaccaac	atccccaac	tccccacac	taaagtfcac
gccataatg	taggcactct	ttctgggtgt	gggacagcag	agcaatacgg	aggggagatt
acacaacgag	ccacaattgg	ggagatgta	gccatctcac	tcgaccctgc	gactttggc
aacgctcaat	taccaccaaa	atttgggctg	gagftgaggg	gaccgtgttc	cagcgtgta
ggaccagcaa	cacacacggt	atcaacagca	accaacgccc	ccgtaatgc	accagtact
gcgaggtgt	gggccagggt	cgttccagat	gcgagttggc	gaaccctaag	ccgacaggt
acttttggg	acgggcagta	gcaatctggg	gctggagacc	cggtgtatat	aaaggggtgg

agaggacgga ttattagcac caacacacac acttatacta ca

SEQ ID NO:2 показывает промотор *HYP* из *Yarrowia lipolytica*.

tcgcgctcag	aaggggcagc	tctaaacgaa	gaactgcggt	caggtgacac	aacttttcc
atctcagggt	gtgtcgcgtg	tgcttcatcc	aaactttagt	tggggttcgg	gttcgcgcga
gatgatcacg	tgccctgatt	tggtgtcgtc	ccccgtcgcg	ctgcgcacgt	gattatttta
ttccgggtgg	ctgctgtcta	cgcggggcct	tctctgcctt	tctgttcaa	ccttcgggcg
gttctcgtaa	ccagcagtag	caatccattt	cgaactcaa	agagctaaaa	acgttaaac
tcagcagtcg	ctcgcagaat	gggctcgggt	tgggaagccc	acgaggccta	tagccagagc
ctcaggttga	caggagccca	gacgcctttt	ccaacggcaa	ctttatata	aaatggcaat
gtattcatgc	aattgcggcc	gtgtcagggt	ggagacactg	gaccacactc	tccattgctt
cctgaggaga	tggatcattg	ctagtcatc	tacgcgcagc	aatcccgcaa	gctcgacaac
cgtagatggg	ctttgtgggg	ccaatcaatt	acgcaacccg	cacgttaa	tgtagagga
aggaaggcca	cggtacaaag	tgggtggct	tcaccagtg	gtgtgtgtg	gcgtcatgca
gaccatgcat	tgggatagc	acagggttgg	ggtgtcttgt	ggactcaatg	ggtgaaagga
gatgaaaaag	ggcggtgaaa	agtgttagaa	tcgaaatccc	tgactcaat	ttataaagta
aaatgcgttt	ctgccatttt	gctcccctcc	ttcttcgca	atcgcctccc	caaaagtgt
cgtagcagta	catatgcttg	catacaatga	agctaatccg	gcttctcag	tagttgctat
atccaggcat	ggtgtgaaac	ccctcaaagt	atatatagga	gctgtgagcc	ccagctctggg

gtctttcttc tccatctcaa aactatttc tcaca

Осуществление изобретения

Настоящее изобретение направлено на новые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, которые представляют собой промоторы. Промотор изобретения представляют собой участок ДНК, который направляет транскрипцию связанного кодирующего участка (гена).

Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включает а) полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или б) нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или

SEQ ID NO: 2 в жестких условиях, или с) функционально эквивалентные фрагменты последовательностей по пунктам а) или b).

Особенно предпочтительные рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты имеют идентичность, равную по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, в особенности предпочтительно по меньшей мере 99%, с соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или 2. Процент идентичности может быть найден на протяжении последовательности, равной по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 800 нуклеотидов, или на протяжении всей последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях вышеупомянутые гомологи SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 получают из полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 путем замены, вставки или делеции нуклеотидов.

Изобретение также относится к рекомбинантным молекулам нуклеиновой кислоты, включающим нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностями нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в жестких условиях.

В одном из аспектов изобретение относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, как показано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или к нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в жестких условиях, или к функционально эквивалентным фрагментам вышеприведенных последовательностей, в которой рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты функционирует в качестве промотора.

Последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, каждая, представляют собой последовательность промотора, клонированного из *Yarrowia lipolytica*.

В некоторых воплощениях промотор может быть применен для регуляции экспрессии гена в дрожжах, включая, без ограничений, род *Yarrowia*. В конкретном воплощении промотор может быть применен в регуляции экспрессии гена в штамме *Yarrowia lipolytica*.

Промотор изобретения может обладать активностью промотора, по меньшей мере в дрожжах, и включает полноразмерные последовательности промотора и их функциональные фрагменты, слитые последовательности и гомологи природного промотора. Ферменты рестрикции могут быть применены для расщепления молекул нуклеиновой кислоты изобретения, с последующим соответствующим анализом для определения минимальной последовательности, необходимой для активности промотора. Такие фрагменты сами по себе индивидуально представляют собой воплощения настоящего изобретения. Гомолог промотора отличается от природного промотор тем, что по меньшей мере один, два, три или несколько нуклеотидов удаляют, вставляют, меняют местами, замещают и/или дериватизируют. Гомолог промотора может сохранять активность в качестве промотора, по меньшей мере в дрожжах, хотя активность может быть увеличена, уменьшена или поставлена в зависимость от определенных стимулов. Промоторы изобретения могут включать один или несколько элементов последовательности, придающих способность контролировать развитие и регуляцию экспрессии.

Было обнаружено, что два новых промотора (промоторы HSP и HYP, проиллюстрированные последовательностями SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно) и их гомологи особенно хорошо подходят для усиления экспрессии целевого гена в дрожжах, в особенности в *Yarrowia*, до относительно высокого уровня. Примеры целевого гена включают гены, вовлеченные в путь получения каротиноидов и других изопреноидов. В некоторых воплощениях промоторы HSP и HYP, включая их гомологи, могут привести к накоплению каротиноидов в относительно высокой концентрации.

В предпочтительных воплощениях настоящее изобретение обеспечивает два клонированных промотора дрожжей (промоторы HSP и HYP, соответственно).

Клонированный промотор дрожжей означает промотор дрожжей, клонированный с помощью стандартной процедуры клонирования, которую применяют в генной инженерии для перемещения сегмента ДНК из его природного местоположения в другой участок, где его будут воспроизводить. Способ клонирования включает вырезание и выделение желаемого сегмента ДНК, встраивание куска ДНК в молекулу вектора и включение рекомбинантного вектора в клетку, где будут реплицированы многочисленные копии или клоны сегмента ДНК.

Последовательность ДНК промотора дрожжей изобретения может быть изолирована из штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Альтернативно, последовательность промотора изобретения может быть сконструирована на основе последовательности ДНК, представленной как последовательность ДНК, показанная в последовательностях SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Промотор дрожжей означает нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности) на 5'-конце структурного гена, которая управляет (которые управляют) инициацией транскрипции. Последовательность промотора должна управлять экспрессией гена, расположенного по ходу транскрипции. Промотор направляет транскрипцию путем обеспечения сайтов связывания для РНК-полимераз и других факторов инициации и активации. Обычно промотор направляет транскрипцию предпочтительно в направлении по ходу транскрипции. Промотор регулирует уровень транскрипции. Таким образом, в

конструкции комбинаций гетерологичный промотор/структурный ген, структурный ген помещают под регулирующий контроль промотора, так чтобы последовательность (последовательности) промотора контролировали экспрессию гена. Промотор помещают предпочтительно выше структурного гена и на расстоянии от сайта старта транскрипции, что приблизительно соответствует расстоянию между промотором и геном, который он контролирует, в его природной обстановке. Как известно в данной области техники, может быть допустимо некоторое изменение этого расстояния без потерь функции промотора.

Эффективность транскрипции промотора может быть определена, например, путем прямого измерения количества транскрипции мРНК от промотора, например, Нозерн-блоттингом или удлинением праймера, или опосредованно, путем измерения количества продукта гена, экспрессированного от промотора.

Термин "транскрипция" означает в соответствии с изобретением способ, с помощью которого получают комплементарную молекулу РНК, начиная от матрицы ДНК. В данный способ вовлечены такие белки, как РНК-полимераза, так называемые сигма-факторы и транскрипционные регуляторные белки. Затем синтезированная РНК служит в качестве матрицы в способе трансляции, который затем приводит к биосинтетически активному белку.

Термин "функциональная связь" означает в этой связи, например, последовательное расположение одного из промоторов изобретения и последовательности нуклеиновой кислоты, которая будет экспрессирована, и, в случае необходимости, дополнительные регуляторные элементы, такие, например, как терминатор, таким образом, что каждый из регуляторных элементов способен выполнять свою функцию в экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты. Прямая связь в химическом смысле не является абсолютно необходимой для этого. Генетический контроль последовательности, такой, например, как последовательности энхансера, также может выполнять свои функции на целевой последовательности с более отдаленных позиций или даже из другой молекулы ДНК. Предпочтителен порядок расположения, при котором последовательность нуклеиновой кислоты, которая будет экспрессирована, или ген, который будет экспрессирован, размещены после (т.е. на 3'-конце) последовательности промотора изобретения, для того чтобы две последовательности были ковалентно соединены между собой. Расстояние между последовательностью промотора и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая будет экспрессирована, может быть, например, менее чем 200 пар оснований, меньше чем 100 пар оснований или меньше чем 50 пар оснований.

Термин "активность экспрессии" или "скорость экспрессии" означает количество белка, продуцируемого в течение установленного периода времени. В настоящем изобретении белок кодируется геном, который функционально связан или с промотором HSP, или с промотором HYP.

Термин "вызванная активность экспрессии" или "вызванная скорость экспрессии" означает количество белка, продуцируемое в течение установленного периода времени, когда была вызвана продукция такого белка. В настоящем изобретении продукцию белка вызывают, когда кодирующий белок ген функционально связывают или с промотором HSP, или с промотором HYP, но белок не продуцируется в заметном количестве, если данные промоторы функционально не связаны с геном.

Скорость образования, при которой получают биосинтетически активный белок/фермент, представляет собой результат скорости транскрипции и трансляции. Существует возможность в соответствии с изобретением воздействовать на обе скорости и, таким образом, воздействовать на скорость образования продуктов в микроорганизме.

Экспрессия "гетерологичного" гена в соответствии с изобретением означает, что промотор и функционально соединенный с ним ген не существуют в природе в такой компоновке в организме дикого типа. Экспрессия гетерологичных генов, таким образом, включает случаи, когда промотор или ген, которые будут экспрессированы, или оба компонента не существуют в природе в диком типе соответствующего организма, или иначе, когда как промотор, так и ген, которые будут экспрессированы, в природных условиях присутствуют в организме дикого типа, но находятся на удаленных хромосомных позициях, так что не существует никакой функциональной связи в организме дикого типа.

Термин "дикий тип" или "организм дикого типа" означает в соответствии с изобретением соответствующий исходный организм.

В зависимости от контекста термин "организм" может означать исходный организм (дикий тип) или генетически модифицированный организм изобретения, например организм рода *Yarrowia*.

Термин "замена" означает обмен одного или нескольких нуклеотидов на один или нескольких нуклеотидов. "Делеция" представляет собой замену нуклеотида путем непосредственной связи. Вставки представляют собой введение нуклеотидов в последовательность нуклеиновой кислоты, где есть формальная замена непосредственной связи одним или несколькими нуклеотидами.

Идентичность между двумя нуклеиновыми кислотами означает идентичность нуклеотидов по всей длине нуклеиновой кислоты в каждом случае, в особенности идентичность рассчитывают путем сравнения с помощью программного обеспечения "Vector NTI Suite 7.1" от "Informax" (USA), применяя способ Clustal (Higgins D.G, Sharp P.M., (1998), Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl. Biosci.* 5(2): 151-1), устанавливая следующие параметры:

Параметры множественного выравнивания:

Штраф на внесение делеции в выравнивание 10.
 Штраф на продолжение делеции 10.
 Диапазон штрафа за разделение делеций 8.
 Снятие штрафа за разделение делеций.
 % идентичности за задержку выравнивания 40.
 Остаток конкретных исключенных делеций.
 Гидрофильный остаток исключенных делеций.
 Присвоение веса транзициям 0.
 Параметр попарного выравнивания:
 Алгоритм FAST включен.
 Размер участка максимального совпадения (K-tuple size) 1.
 Штраф за пропуск в последовательности 3.
 Размер окна 5.
 Число наилучших диагоналей 5.

Например, последовательность нуклеиновой кислоты, имеющая идентичность, равную по меньшей мере 70% с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 соответственно, означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая при сравнении ее последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, в особенности в соответствии с приведенным выше алгоритмом программирования с указанным выше набором параметров, показывает идентичность, равную по меньшей мере 70%.

Термин "гибридизация" означает способность поли- или олигонуклеотида связываться в жестких условиях с практически комплементарной последовательностью, в то время как неспецифические связывания между некомплементарными партнерами не происходят в данных условиях. Для этого последовательности предпочтительно должны быть на 90-100% комплементарны. Свойство комплементарных последовательностей быть способными специфически связываться друг с другом применяют, например, в методиках Нозерн- или Саузерн-блоттинга или при связывании праймера в ПЦР или ОТ-ПЦР.

Гибридизация в соответствии с изобретением происходит в жестких условиях. Такие условия гибридизации описаны, например, в руководстве Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pages 9.31-9.57, или в руководстве *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Строгие условия гибридизации в особенности означают: Инкубация в течение ночи при 42°C в растворе, состоящем из 50% формамида, 5XSSC (750 mM NaCl, 75 mM тринатрий цитрата), 50 mM фосфата натрия (pH 7,6), 5X раствора Денхардта, 10% сульфата декстрана и 20 г/мл денатурированной, деградированной в результате гидродинамического сдвига ДНК спермы лосося, с последующей промывкой фильтров с 0,1XSSC при 65°C.

Термин "функционально эквивалентный фрагмент" означает фрагменты промоторов, которые имеют по существу такую же активность промотора, как исходная последовательность.

Термин "фрагменты" означает частичные последовательности промоторов, описанных в изобретении.

В особенности предпочтительно применять последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в качестве промотора для экспрессии генов в организмах рода *Yarrowia*.

Все вышеупомянутые промоторы могут быть дополнительно получены способом, известным как таковой, путем химического синтеза из нуклеотидных строительных блоков, таким как, например, путем конденсации фрагментов индивидуального перекрытия, комплементарных строительных блоков нуклеиновых кислот двойной спирали. Химический синтез олигонуклеотидов можно проводить, например, известным способом по фосфорамидатному методу (Voet, Voet, (1995), *Biochemistry*, 2nd edition, Wiley Press New York, p. 896-897). Добавление синтетических олигонуклеотидов и заполнение пробелов с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы и реакций лигирования и общие способы клонирования описаны в руководстве Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В принципе, любой ген может быть экспрессирован с промоторами изобретения в организмах рода *Yarrowia*. Данные гены, которые будут экспрессированы в организмах рода *Yarrowia*, далее в настоящем документе также называют "генами эффекта".

Предпочтительные гены эффекта представляют собой гены из биосинтетических путей биосинтетических продуктов, которые могут быть получены в организмах рода *Yarrowia*, т.е., в диком типе или путем генетического изменения дикого типа.

Предпочтительные биосинтетические продукты представляют собой химические продукты тонкого органического синтеза. Термин "химический продукт тонкого органического синтеза" известен в данной области техники и включает соединения, которые вырабатываются организмом и которые применяют в различных отраслях промышленности, таких как, например, но без ограничений, фармацевтическая промышленность, сельское хозяйство, производство косметических изделий, продуктов питания и кормов. Данные соединения включают органические кислоты, такие как, например, винная кислота, итаконовая кислота и диаминопимелиновая кислота, липиды, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты (на-

пример, арахидоновую кислоту), диолы (например, пропандиол и бутандиол), ароматические соединения (например, ароматические амины, ванилин и индиго), каротиноиды и витамины и кофакторы.

Высшие животные утратили способность синтезировать витамины, каротиноиды, кофакторы и нутрицевтики, и, следовательно, им необходимо их принимать, хотя они легко синтезируются другими организмами, такими как бактерии. Данные молекулы представляют собой или биологически активные молекулы как таковые, или предшественников биологически активных веществ, которые служат в качестве переносчиков электронов или интермедиатов в ряде метаболических путей. Данные соединения имеют, помимо питательной ценности, также значительное промышленное значение в качестве красителей, антиоксидантов и катализаторов или соединений для улучшения технологических свойств. Термин "витамин" известен в данной области техники и включает питательные вещества, которые требуются организму для нормального функционирования, но не могут быть синтезированы самим этим организмом. Группа витаминов может включать кофакторы и нутрицевтические соединения. Термин "кофактор" включает небелковые соединения, которые необходимы для проявления нормальной энзиматической активности. Данные соединения могут быть органическими или неорганическими; молекулы кофакторов изобретения предпочтительно представляет собой органические вещества. Термин "нутрицевтический" включает пищевые добавки, которые содействуют укреплению здоровья организмов и животных, в особенности людей. Примеры таких молекул - это витамины, антиоксиданты и также некоторые липиды (например, полиненасыщенные жирные кислоты).

Каротиноиды, такие как, например, фитоин, ликопин, бета-каротин, лютеин, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин, эхиненон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин, виолаксантин и адониксантин, представляют собой предпочтительные химические продукты тонкого органического синтеза или биосинтетические продукты, которые могут быть получены в организмах рода *Yarrowia*.

Предпочтительные каротиноиды - это такие кетокаротиноиды, как, например, астаксантин, кантаксантин, эхиненон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин и адониксантин.

Предпочтительные гены, экспрессируемые в дрожжах под контролем промоторов изобретения, представляют собой соответственно гены, которые выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих белок из а) биосинтетического пути органических кислот, б) биосинтетического пути липидов и жирных кислот, с) биосинтетического пути диолов, d) биосинтетического пути ароматических соединений, e) биосинтетического пути витаминов или f) биосинтетического пути каротиноидов, в особенности кетокаротиноиды.

Предпочтительные гены, экспрессируемые в организмах рода *Yarrowia* под контролем промоторов изобретения, представляют собой соответственно гены, которые кодируют белки из биосинтетического пути каротиноидов.

Предпочтительные гены выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих кетолазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-гидроксилазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [эпсилон]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих зеаксантин эпоксидазу, нуклеиновых кислот, кодирующих антераксантин эпоксидазу, нуклеиновых кислот, кодирующих неоксантин-синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих НМГ-СoA редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-Д-ксилоза-5-фосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-Д-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих изопентил-дифосфат-[дельта]-изомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фарнезил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин-синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин-десатуразу (фитоин дегидрогеназу), нуклеиновых кислот, кодирующих префитоин-синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих зета-каротин десатуразу, нуклеиновых кислот, кодирующих белок crtISO, нуклеиновых кислот, кодирующих 4-дифосфотидил-2-С-метил-Д-эритритол синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 4-дифосфотидил-2-С-метил-Д-эритритол киназу, нуклеиновых кислот, кодирующих 2-метил-Д-эритритол-2,4-циклодифосфат синтазу, и нуклеиновых кислот, кодирующих гидроксиметилбутенил-дифосфат синтазу.

Кетолаза означает белок, который обладает энзиматической активностью введения кетогруппы в необязательно замещенное [бета]-ионное кольцо каротиноидов. Кетолаза в особенности означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения [бета]-каротина в кантаксантин. Примеры нуклеиновых кислот, кодирующих кетолазу и соответствующие кетолазы, представляют собой, например, последовательности из *Haematococcus pluvialis*, в особенности из *Haematococcus pluvialis*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alicigenes*, *Paracoccus marcusii*, *Synechocystis*, *Bradyrhizobium*, *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Nodularia spumigena*.

[Бета]-циклаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения концевое остатка линейного ликопина в [бета]-ионное кольцо. [Бета]-циклаза в особенности означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения [гамма]-каротина в [бета]-каротин. Примеры генов [бета]-циклазы представляют собой нуклеиновые кислоты, кодирующие [бета]-циклазы со следующими номерами доступа: S66350 ликопин бета-циклаза, САА60119 ликопин синтаза,

AAG10429 бета-циклаза [*Yarrowia erecta*], AAA81880 ликопин циклаза, AAB53337 ликопин бета-циклаза, AAL92175 бета-ликопин циклаза [*Sandersonia aurantiaca*], CAA67331 ликопин циклаза [*Narcissus pseudonarcissus*], AAM45381 бета-циклаза [*Yarrowia erecta*], AAL01999 ликопин циклаза [*Xanthobacter* sp. Py2], ZP_000190 гипотетический белок [*Chloroflexus aurantiacus*], AAF78200 ликопин циклаза [*Bradyrhizobium* sp. ORS278], BAV79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*], CAA64855 ликопин циклаза [*Streptomyces griseus*], AAA21262 ликопин циклаза [*Pantoea agglomerans*], C37802 crtY белок - *Erwinia uredovora*, BAV79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*], AAA64980 ликопин циклаза [*Pantoea agglomerans*], AAC44851 ликопин циклаза, BAA09593 ликопин циклаза [*Paracoccus* sp. MBIC1143], CAB56061 ликопин бета-циклаза [*Paracoccus marcusii*], BAA20275 ликопин циклаза [*Erythrobacter longus*], AAK07430 ликопин бета-циклаза [*Adonis palaestina*], CAA67331 ликопин циклаза [*Narcissus pseudonarcissus*], AAB53337 ликопин бета-циклаза, BAC77673 ликопин бета-моноциклаза [морская бактерия P99-3].

Гидроксилаза означает белок, который обладает энзиматической активностью введения гидроксигруппы в необязательно замещенное [бета]-иононное<?> кольцо каротиноидов. Гидроксилаза в особенности означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения [бета]-каротина в зеаксантин или кантаксантина в астаксантин. Примеры гена гидроксилазы представляют собой: нуклеиновую кислоту, кодирующую гидроксилазу из *Haematococcus pluvialis*, номер доступа AX038729, WO 0061764; и гидроксилазы со следующими номерами доступа: CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108-1, AF315289-1, AF296158-1, AAC49443.1, NP-194300.1, NP-200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.11 AAL80006.1, AF162276-1, AA053295.1, MN85601.1, CRTZ_ERWHE, CRTZ_PANAN, BAV79605.1, CRTZ_ALCSP, CRTZ_AGRAU, CAB56060.1, ZP-00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP-745389.1, NP-344225.1, NP-849490.1 ZP-00087019.1, NP-503072.1, NP-852012.1, NP-115929.1, ZP-00013255.1.

HMG-CoA редуктаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А в мевалонат.

(Е)-4-Гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфата в изопентил-дифосфат и диметилаллил-дифосфаты.

1-Дезокси-D-ксилоза-5-фосфат синтаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения гидроксиэтил-ThPP и глицеральдегид-3-фосфата в 1-дезокси-D-ксилоза-5-фосфат.

1-Дезокси-D-ксилоза-5-фосфат редуктоизомераза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения 1-дезокси-D-ксилоза-5-фосфата в 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат.

Изопентил-дифосфат [дельта]-изомераза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения изопентил-дифосфата в диметилаллил-фосфат.

Геранил-дифосфат синтаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения изопентил-дифосфата и диметилаллил-фосфата в геранил-дифосфат.

Фарнезил-дифосфат синтаза означает белок, который обладает энзиматической активностью последовательного превращения 2-х молекул изопентил-дифосфата с диметилаллил-дифосфатом и полученного в результате геранил-дифосфата в фарнезил-дифосфат.

Геранил-геранил-дифосфат синтаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения фарнезил-дифосфата и изопентил-дифосфата в геранил-геранил-дифосфат.

Фитоин-синтаза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения геранил-геранил-дифосфата в фитоин.

Фитоин десатураза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения фитоина в фитофлуен и/или фитофлуена в 4-каротин (зета-каротин).

Зета-каротин десатураза означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения [зета]-каротина в нейроспорин и/или нейроспорина в ликопин.

Белок crtISO означает белок, который обладает ферментативной активностью превращения 7,9,7',9'-тетра-цис-ликопина в полностью-транс-ликопин.

Примеры генов HMG-CoA редуктазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую HMG-CoA редуктазу из *Arabidopsis thaliana*, номер доступа NM-106299 и дополнительные гены HMG-CoA редуктазы из других организмов со следующими номерами доступа: P54961, P54870, P54868, P54869, O02734, P22791, P54873, P54871, P23228, P13704, P54872, Q01581, P17425, P54874, P54839, P14891, P34135, O64966, P29057, P48019, P48020, P12683, P43256, Q9XEL8, P34136, O64967, P29058, P48022, Q41437, P12684, Q00583, Q9XHL5, Q41438, Q9YAS4, O76819, O28538, Q9Y7D2, P54960, O51628, P48021, Q03163, P00347, P14773, Q12577, Q59468, P04035, O24594, P09610, Q58116, O26662, Q01237, O01559, Q12649, O74164, O59469, P51639, O10283, O08424, P20715, P13703, P13702, Q96UG4, Q8SQZ9, O15888, Q9TUM4, P93514, Q39628, P93081, P93080, Q944T9, Q40148, Q84MM0, Q84LS3, Q9Z9N4, Q9KLM0.

Примеры генов (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазу из *Arabidopsis*

thaliana (lytB/ISPH) и дополнительные гены (E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазы из других организмов со следующими номерами доступа: T04781, AF270978-1, NP-485028.1, NP-442089.1, NP-681832.1, ZP-00110421.1, ZP-00071594.1, ZP-00114706.1, ISPH_SYNY3, ZP-00114087.1, ZP-00104269.1, AF398145-1, AF398146-1, AAD55762.1, AF514843-1, NP-622970.1, NP-348471.1, NP-562001.1, NP-223698.1, NP-781941.1, ZP-00080042.1, NP-859669.1, NP-214191.1, ZP-00086191.1, ISPH_VIBCH, NP-230334.1, NP-742768.1, NP-302306.1, ISPH_MYCLE, NP-602581.1, ZP-00026966.1, NP-520563.1, NP-253247.1, NP-282047.1 ZP-00038210.1, ZP-00064913.1, CAA61555.1, ZP-00125365.1, ISPH_ACICA, EAA24703.1, ZP-00013067.1, ZP-00029164.1, NP-790656.1, NP-217899.1, NP-641592.1, NP-636532.1, NP-719076.1, NP-660497.1, NP-422155.1, NP-715446.1, ZP-00090692.1, NP-759496.1, ISPH_BURPS, ZP-00129657.1, NP-215626.1, NP-335584.1, ZP-00135016.1, NP-789585.1, NP-787770.1, NP-769647.1, ZP-00043336.1, NP-242248.1, ZP-00008555.1, NP-246603.1, ZP-00030951.1, NP-670994.1, NP-404120.1, NP-540376.1, NP-733653.1, NP-697503.1, NP-840730.1, NP-274828.1, NP-796916.1, ZP-00123390.1, NP-824386.1, NP-737689.1, ZP-00021222.1, NP-757521.1, NP-390395.1, ZP-00133322.1, CAD76178.15 NP-600249.1, NP-454660.1, NP-712601.1, NP-385018.1, NP-751989.1.

Примеры генов 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат синтазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат синтазу из *Lycopersicon esculentum* и дополнительные гены 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат синтазы из других организмов со следующими номерами доступа: AF143812-1, DXS_CAPAN, CAD22530.1, AF182286-1, NP-193291.1, T52289, AAC49368.1, AAP14353.1, D71420, DXS_ORYSA, AF443590-1, BAB02345.1, CAA09804.2, NP-850620.1, CAD22155.2, AAM65798.1, NP-566686.1; CAD22531.1, AAC33513.1, CAC08458.1, AAG10432.1, T08140, AAP14354.1, AF428463-1, ZP-00010537.1, NP-769291.1, AAK59424.1, NP-107784.1, NP-697464.1, NP-540415.1, NP-196699.1, NP-384986.1, ZP-00096461.1, ZP-00013656.1, NP-353769.1, BAA83576.1, ZP-00005919.1, ZP-00006273.1, NP-420871.1, AAM48660.1, DXS_RHOCA, ZP-00045608.1, ZP-00031686.1, NP-841218.1, ZP-00022174.1, ZP-00086851.1, NP-742690.1, NP-520342.1, ZP-00082120.1, NP-790545.1, ZP-00125266.1, CAC17468.1, NP-252733.1, ZP-00092466.1, NP-439591.1, NP-414954.1, NP-752465.1, NP-622918.1, NP-286162.1, NP-836085.1, NP-706308.1, ZP-00081148.1, NP-797065.1, NP-213598.1, NP-245469.1, ZP-00075029.1, NP-455016.1, NP-230536.1, NP-459417.1, NP-274863.1, NP-283402.1, NP-759318.1, NP-406652.1, DXS_SYNLE, DXS_SYNP7, NP-440409.1, ZP-00067331.1, ZP-00122853.17 NP-717142.1, ZP-00104889.1, NP-243645.1, NP-681412.1, DXS_SYNEL, NP-637787.1, DXS-CHLTE, ZP-00129863.1, NP-661241.1, DXS_XANCP, NP-470738.1, NP-484643.1, ZP-00108360.1, NP-833890.1, NP-846629.1, NP-658213.1, NP-642879.1, ZP-00039479.1, ZP-00060584.1, ZP-00041364.1, ZP-00117779.1, NP-299528.1.

Примеры генов 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразы представляют собой: нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразу из *Arabidopsis thaliana* и дополнительные гены 1-дезоксидеокси-D-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразы из других организмов со следующими номерами доступа: AF148852, AY084775, AY054682, AY050802, AY045634, AY081453, AY091405, AY098952, AJ242588, AB009053, AY202991, NP-201085.1, T52570, AF331705-1, BAB16915.1, AF367205-1, AF250235-1, CAC03581.1, CAD22156.1, AF182287-1, DXR_M ENPI, ZP-00071219.1, NP-488391.1, ZP-00111307.1, DXR_SYNLE, AAP56260.1, NP-681831.1, NP-442113.1, ZP-00115071.1, ZP-00105106.1, ZP-00113484.1, NP-833540.1, NP-657789.1, NP-661031.1, DXR-BACHD, NP-833080.1, NP-845693.1, NP-562610.1, NP-623020.1, NP-810915.1, NP-243287.1, ZP-00118743.1, NP-464842.1, NP-470690.1, ZP-00082201.1, NP-781898.1, ZP-00123667.1, NP-348420.1, NP-604221.1, ZP-00053349.1, ZP-00064941.1, NP-246927.1, NP-389537.1, ZP-00102576.15 NP-519531.1, AF124757-19, DXR_ZYMMO, NP-713472.1, NP-459225.1, NP-454827.1, ZP-00045738.1, NP-743754.1, DXR_PSEPK, ZP-00130352.1, NP-702530.1, NP-8417441, NP-438967.1, AF514841-1, NP-706118.1, ZP-00125845.1, NP-404661.1, NP-285867.1, NP-240064.1, NP-414715.1, ZP-00094058.1, NP-791365.1, ZP-00012448.1, ZP-00015132.1, ZP-00091545.1, NP-629822.1, NP-771495.1, NP-798691.1, NP-231885.1, NP-252340.1, ZP-00022353.1, NP-355549.1, NP-420724.1., ZP-00085169.1, EAA17616.1, NP-273242.1, NP-219574.1 NP-387094.1, NP-296721.1, ZP-00004209.1, NP-823739.1, NP-282934.1, BAA77848.1, NP-660577.1, NP-760741.1, ZP-00038451.1, DXR_KITGR, NP-778563.1.

Примеры генов изопентил-дифосфат-[дельта]-изомеразы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую изопентил-дифосфат-[дельта]-изомеразу из *Adonis palaestina* и дополнительные гены изопентил-дифосфат-[дельта]-изомеразы из других организмов со следующими номерами доступа: Q38929, O48964, Q39472, Q13907, O35586, P58044, O42641, O35760, Q10132, P15496, Q9YB30, Q8YNH4, Q42553, O27997, P50740, O51627, O48965, Q8KFR5, Q39471, Q39664, Q9RVE2, Q01335, Q9HNE4, Q9BXS1, Q9KWF6, Q9CIF5, Q88WB6, Q92BX2, Q8Y7A5, Q8TT35 Q9KK75, Q8NN99, Q8XD58, Q7FE75, Q46822, Q9HP40, P72002, P26173, Q9Z5D3, Q8Z3X9, Q8ZM82, Q9X7Q6, O13504, Q9HFW8, Q8NJJL9, Q9UUQ1, Q9NH02, Q9M6K9, Q9M6K5, Q9FXR6, O081691, Q9S7C4, Q8S3L8, Q9M592, Q9M6K3, Q9M6K7, Q9FV48, Q9LLB6, Q9AVJ1, Q9AVG8, Q9M6K6, Q9AVJ5, Q9M6K2, Q9AYS5, Q9M6K8, Q9AVG7, Q8S3L7, Q8W250, Q94IE1, Q9AV18, Q9AYS6, Q9SAY0, Q9M6K4, Q8GVZ0, Q84RZ8, Q8KZ12, Q8KZ66, Q8FND7, Q88QC9, Q8BFZ6, BAC26382, CAD94476.

Примеры генов геранил-дифосфат синтазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую геранил-дифосфат синтазу из *Arabidopsis thaliana* и дополнительные гены геранил-дифосфат синта-

зы из других организмов со следующими номерами доступа: Q9FT89, Q8LKJ2, Q9FSW8, Q8LKJ3, Q9SBR3, Q9SBR4, Q9FET8, Q7LKJ1, Q84LG1, Q9JK86.

Примеры генов фарнезил-дифосфат синтазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую фарнезил-дифосфат синтазу из *Arabidopsis thaliana* и дополнительные гены фарнезил-дифосфат синтазы из других организмов со следующими номерами доступа: P53799, P37268, Q02769, Q09152, P49351, O24241, Q43315, P49352, O24242, P49350, P08836, P14324, P49349, P08524, O66952, Q082911, P54383, Q45220, P57537, Q8K9A0, P22939, P45204, O66126, P55539, Q9SWH9, Q9AVI7, Q9FRX2, Q9AYS7, Q94IE8, Q9FXR9, Q9ZWF6, Q9FXR8, Q9AR37, O50009, Q94IE9, Q8RVK7, Q8RVQ7, O04882, Q93RA8, Q93RB0, Q93KB4, Q93RB5, Q93RB3, O93RB1, Q93RB2, Q920E5.

Примеры генов геранил-геранил-дифосфат синтазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую геранил-геранил-дифосфат синтазу из *Sinapis alba* и дополнительные гены геранил-геранил-дифосфат синтазы из других организмов.

Примеры генов фитоин синтазы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую фитоин синтазу из *Egwinia uredovora* и дополнительные гены фитоин синтазы из других организмов.

Примеры генов фитоин десатуразы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую фитоин десатуразу из *Egwinia uredovora* и дополнительные гены фитоин десатуразы из других организмов.

Примеры генов зета-каротин десатуразы представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую зета-каротин десатуразу из *Narcissus pseudonarcissus* и дополнительные гены зета-каротин десатуразы из других организмов.

Примеры генов crtISO представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую crtISO из *Lycopersicon esculentum* и дополнительные гены crtISO из других организмов.

Изобретение, кроме того, относится к генетически модифицированному микроорганизму рода *Yarrowia*, в котором генетическая модификация приводит к увеличению скорости экспрессии или вызванной экспрессии по меньшей мере одного гена по сравнению с диким типом, и экспрессия вызвана промоторами, описанными в изобретении.

В предпочтительном воплощении генетически модифицированных организмов изобретения рода *Yarrowia*, регуляции экспрессии генов в организме с помощью промоторов изобретения достигают путем:

а) введения одного или нескольких вышеупомянутых рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты в геном указанного микроорганизма, для того чтобы экспрессия одного или нескольких эндогенных генов указанного микроорганизма находилась под контролем введенной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты;

б) введения одного или нескольких генов в геном указанного микроорганизма, для того чтобы экспрессия одного или нескольких введенных генов находилась под контролем вышеупомянутой рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, которая эндогенна указанному микроорганизму; или

с) введения одного или нескольких конструктов нуклеиновых кислот в указанный микроорганизм, в котором указанный один или несколько конструктов нуклеиновых кислот включают по меньшей мере одну вышеупомянутую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, и данная одна или несколько рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты функционально связаны с одним или несколькими генами, которые будут экспрессированы.

В одном из воплощений интеграция конструктов нуклеиновых кислот в микроорганизм рода *Yarrowia* в соответствии с признаком с) может иметь место внутрихромосомно или экстрахромосомно.

Предпочтительные промоторы изобретения и предпочтительные гены, которые будут экспрессированы (гены эффекта), были описаны выше.

Получение генетически модифицированных микроорганизмов рода *Yarrowia* с увеличенной или вызванной скоростью экспрессии гена эффекта будет описано с помощью приведенных ниже примеров.

В случае комбинаций генетических модификаций трансформация может иметь место по отдельности или с несколькими конструкциями.

Трансгенные организмы предпочтительно получают путем трансформации исходных организмов конструктами нуклеиновой кислоты, которые включают по меньшей мере один описанный выше промотор изобретения, который функционально связан с геном эффекта, который будет экспрессирован, и, в случае необходимости, с дополнительными регуляторными сигналами.

Данные конструкты нуклеиновых кислот, в которых промоторы изобретения и гены эффекта функционально связаны, далее в настоящем документе также называют экспрессионными кассетами.

Экспрессионные кассеты могут включать дополнительные регуляторные сигналы, которые представляют собой регуляторные последовательности нуклеиновой кислоты, которые контролируют экспрессию генов эффекта в клетке-хозяине. В предпочтительном воплощении экспрессионная кассета включает по меньшей мере один промотор изобретения, расположенный против хода транскрипции, т.е., на 5'-конце кодирующей последовательности, и сигнал полиаденилирования и, в случае необходимости, дополнительные регуляторные элементы, которые оперативно связаны с кодирующей последовательностью, лежащей между ними, гена эффекта по меньшей мере для одного из описанных выше генов, расположенного по ходу транскрипции, т.е., на 3'-конце.

Оперативная связь означает последовательное расположение промотора, кодирующего последовательность, терминатора и, в случае необходимости, дополнительных регуляторных элементов таким образом, чтобы каждый из регуляторных элементов может завершить свою функцию, как предполагалось при экспрессии кодирующей последовательности.

Предпочтительные конструкторы нуклеиновых кислот, экспрессионные кассеты и векторы для организмов, способы получения трансгенных организмов и сами трансгенные организмы рода *Yarrowia*, описаны в WO 2006/102342 и с помощью приведенных ниже примеров.

Нуклеиновые кислоты изобретения могут быть получены путем синтеза или получены природным путем или включать смесь синтетических и природных составляющих нуклеиновых кислот и состоять из различных сегментов гетерологичных генов из разных организмов.

Предпочтение отдают, как описано выше, синтетическим нуклеотидным последовательностям с кодонами, предпочтительными для организмов. Данные предпочтительные для организмов кодоны могут быть определены из кодонов с самой высокой обеспеченностью белком, который экспрессируется в большинстве представляющих интерес видов организмов.

Существует возможность при получении экспрессионной кассеты манипулировать различными фрагментами ДНК для того, чтобы получить нуклеотидную последовательность, которая целесообразно читает в правильном направлении и которая оснащена правильной рамкой считывания. Адапторы или линкеры могут быть присоединены к фрагментам для объединения фрагментов ДНК.

Целесообразно иметь возможность обеспечивать области промотора и терминатора в направлении транскрипции линкером или полилинкером, включающим один или нескольких сайтов рестрикции для вставки этой последовательности. Как правило, линкер имеет от 1 до 10, в большинстве случаев от 1 до 8, предпочтительно от 2 до 6 сайтов рестрикции. В основном линкер в пределах регуляторных областей имеет размер менее чем 100 п.о., часто менее чем 60 п.о., но по меньшей мере 5 п.о. Промотор может быть как природным, или гомологичным, так и чужеродным, или гетерологичным по отношению к организму-хозяину. Экспрессионная кассета предпочтительно включает, в направлении транскрипции 5'-3', промотор, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты или конструктор нуклеиновой кислоты и область терминации транскрипции. По желанию, различные области терминации могут быть взаимно обменены.

Особенно предпочтительные гены эффекта представляют собой гены, которые выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих кетолазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-гидроксилазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [эпсилон]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих эпоксидазу, нуклеиновых кислот, кодирующих HMG-CoA редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих (E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих изопентил-дифосфат [дельта]-изомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фарнезил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин десатуразу, нуклеиновых кислот, кодирующих префитоин синтазу, и нуклеиновых кислот, кодирующих зета-каротин десатуразу.

Существует возможность с помощью описанных выше способов изобретения регулировать посредством промоторов изобретения метаболические пути до конкретных биосинтетических продуктов в генетически модифицированных организмах изобретения описанного выше рода *Yarrowia*.

Для этой цели, например, метаболические пути, которые ведут к конкретному биосинтетическому продукту, усиливают, вызывая или увеличивая скорость транскрипции или скорость экспрессии генов данного биосинтетического пути посредством увеличения количества фермента, приводящего к повышенной общей активности данных ферментов желаемого биосинтетического пути и, таким образом, к увеличению метаболического потока в направлении желаемого биосинтетического продукта.

Необходимо, в зависимости от желаемого биосинтетического продукта увеличивать или снижать скорость транскрипции или скорость экспрессии различных генов. Обычно выгоднее изменять скорость транскрипции или скорость экспрессии нескольких генов, т.е., увеличивать скорость транскрипции или скорость экспрессии комбинации генов и/или снижать скорость транскрипции или скорость экспрессии комбинации генов.

В генетически модифицированных организмах изобретения по меньшей мере одна увеличенная или вызванная скорость экспрессии гена обусловлена промотором изобретения.

Кроме того, дополнительно измененные, т.е., дополнительно увеличенные или дополнительно сниженные, скорости экспрессии дополнительных генов в генетически модифицированных организмах могут, но необязательно, быть получены под контролем промоторов изобретения.

Изобретение, следовательно, относится к способу получения биосинтетических продуктов культивированием генетически модифицированных организмов изобретения рода *Yarrowia*.

Изобретение относится в особенности к способу получения каротиноидов культивированием генетически модифицированных организмов изобретения рода *Yarrowia*, в котором гены, которые будут экс-

прессированы, выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих кетолазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-гидроксилазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [бета]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих [эпсилон]-циклазу, нуклеиновых кислот, кодирующих эпоксидазу, нуклеиновых кислот, кодирующих HMG-CoA редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих (E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил-дифосфат редуктазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат редуктоизомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих изопентил-дифосфат-[дельта]-изомеразу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фарнезил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих геранил-геранил-дифосфат синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин синтазу, нуклеиновых кислот, кодирующих фитоин десатуразу, нуклеиновых кислот, кодирующих префитоин синтазу, и нуклеиновых кислот, кодирующих зета-каротин десатуразу.

Каротиноиды предпочтительно выбирают из группы, включающей фитоин, фитофлуен, ликопин, лютеин, бета-каротин, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин, эхиненон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин, виолаксантин и адониксантин.

Генетически модифицированные организмы могут, кроме того, быть использованы для производства экстрактов, содержащих биосинтетические продукты, в особенности каротиноиды, в особенности кетокаротиноиды, в особенности астаксантин, и/или для получения добавок для продуктов питания для людей и кормов для животных и косметических и фармацевтических изделий.

Генетически модифицированные организмы рода *Yarrowia* обладают по сравнению с диким типом увеличенным содержанием желаемых биосинтетических продуктов, в особенности каротиноидов, в особенности кетокаротиноидов, в особенност, астаксантина.

В предпочтительном воплощении промотор дрожжей изобретения получают из штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

Именно в настоящее время предполагается, что промотор дрожжей изобретения, т.е., аналогичный промотор дрожжей, может быть получен из других микроорганизмов. Например, промотор дрожжей может быть получен из других штаммов дрожжей, таких как штамм *Saccharomyces cerevisiae*.

В другом аспекте изобретение обеспечивает вектор рекомбинантной экспрессии, включающий промотор дрожжей изобретения.

Вектор экспрессии изобретения может представлять собой любой вектор экспрессии, который удобно подвергается процедурам рекомбинантной ДНК, и выбор вектора часто будет зависеть от клетки-хозяина, в которую он должен быть введен.

Процедуры, примененные для лигирования последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес белок, промотора дрожжей и терминатора соответственно и для встраивания их в подходящие векторы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Еще в одном аспекте изобретение обеспечивает клетку-хозяина, включающую рекомбинантный вектор экспрессии изобретения.

Предпочтительно клетка-хозяин изобретения представляет собой эукариотическую клетку, в особенности клетку дрожжей.

Примеры таких дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваются, штамм *Saccharomyces*, в особенности *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* или *Saccharomyces uvarum*, штамм *Schizosaccharomyces* sp., такой как *Schizosaccharomyces pombe*, штамм *Hansenula* sp., *Pichia* sp., *Yarrowia* sp., такой как *Yarrowia lipolytica*, или *Kluyveromyces* sp., такой как *Kluyveromyces lactis*.

В предпочтительном воплощении штамм *Yarrowia lipolytica* представляет собой подходящего хозяина для настоящего изобретения.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Табл. 1 описывает конкретные штаммы *Yarrowia lipolytica*, примененные в последующих иллюстративных примерах:

Таблица 1

Штаммы *Yarrowia lipolytica*

Название штамма	Генотип	Способ получения
ML2461	<i>MATA erg9-4789::URA3 tef1P-{HMG-tr GGS carB carRP}</i> прототрофный	Классические и стандартные молекулярно-генетические методики
ML6804	<i>MATB erg9-4789::URA3 tef1P-{HMG-tr GGS carB carRP crtW}</i> прототрофный	Классические и стандартные молекулярно-генетические методики
ML326	<i>MATA ura3-302 leu2-270 lys8-11 PEX17-HA</i>	ATCC 201249

Табл. 2 описывает некоторые плазмиды, примененные в последующих иллюстративных примерах.

Таблица 2

Плазмиды

Плаزمида	Основа	Вставка
pMB6056	pMB6052 (Hyg ^R <i>tef1P-xprT</i>)	<i>crtZ</i>
pMB6504	pMB6056	<i>hspP</i>
pMB6509	pMB6056	<i>hypP</i>
pMB6779	pMB6149 (<i>LEU2 lacZ</i>)	<i>hspP</i>
pMB6781	pMB6149	<i>hypP</i>

Штаммы *Yarrowia* ML2461 и ML6804 конструировали путем введения гетерологических генов под контроль эндогенного промотора TEF1 (контроль). Ген GGS и укороченный ген HMG ("HMG-tr") получали из последовательности *Yarrowia*, соответствовавшей природным генам геранил-геранил-пирофосфат синтазы и гидроксиметилглутарил-CoA редуктазы соответственно. Гены *carRP* и *carB* получали из *Mucor circinelloides*, и они кодировали бифункциональную фитоин синтазу/ликопин циклазу и фитоин дегидрогеназу соответственно. Ген *crtW* синтезировали для того, чтобы кодировать каротин кетотазу *Parvularcula bermudensis*. Ген *crtZ* синтезировали для того, чтобы кодировать каротин гидроксилазу *Enterobacter pulveris*. Данные гены иногда, но не всегда, были связаны с ауксотрофными маркерами (URA3, LEU2, URA2, LYS1, ADE1) или сайтом loxP, остатком маркера Hyg^R или Nat^R.

Все основные молекулярно-биологические процедуры и методики работы с ДНК, описанные в настоящем документе, как правило, проводили в соответствии с руководством Sambrook et al. или Ausubel et al. (Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. (eds.). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York).

Пример 1. Получение pMB6504 (Hyg^R HSPp-crtZ), кодирующего промотор HSP, управляющий геном каротин гидроксилазы *crtZ*.

Последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, соответствующую внутригенной области, лежащей выше YALI0D20526g, амплифицировали из геномной ДНК, полученной из *Y. lipolytica* ATCC201249, применяя

MO8250 (5'-CACACAAAGCTTGGTACCAGATAGTGCAATCACATGTTGCTAC) и

MO8251 (5'-CACACATTTTGTGGCTAGCATGTAGTATAAGTGTGTGTGTTGG).

Данный фрагмент, размером 1 т.п.н., расщепляли с помощью NheI и HindIII и лигировали с pMB6056 (TEF1p-crtZ Hyg^R), который разрезали с помощью NheI и HindIII для получения pMB6504 (HSPp-crtZ Hyg^R).

Пример 2. Получение pMB6509 (Hyg^R HYPp-crtZ), кодирующей промотор HYP из *Y. lipolytica*, управляющий геном каротин гидроксилазы *crtZ*.

Последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, соответствующую внутригенной области, лежащей выше YALI0D09889g, амплифицировали из геномной ДНК, полученной из *Y. lipolytica* ATCC201249, применяя

MO8254 (5'-CACACAAAGCTTGGTACCAGATCGCGGTCAGAAGGGGCAG) и

MO8255 (5'-CACACATTTTGTGGCTAGCATGTGAGAAAGTAGTTTTGAGATGG).

Данный 1 т.п.н. фрагмент расщепляли с помощью NheI и HindIII и лигировали с pMB6056 (TEF1p-crtZ Hyg^R), который разрезали с помощью NheI и HindIII, для получения pMB6509 (HYPp-crtZ Hyg^R).

Пример 3. Получение зеаксантина.

pMB6056, pMB6504 и pMB6509 расщепляли NotI и независимо друг от друга трансформировали в ML2461, продуцента бета-каротина, и в ML6804, продуцента кантаксантина. Трансформанты отбирали на YPD, дополненной 100 мг/л гигромицина В. Их инкубировали в течение 48 ч при 30°C. Колонии отбирали на YPD-агаре, дополненном 100 мг/л гигромицина В.

Культуры данных трансформантов растили в течение 72 ч при 30°C в 800 мкл YPD в 2 мл круглодонных 24-луночных планшетах и встряхивали при 800 rpm в "INFORS Multitron". Для экстракции образец объемом 250 мкл отбирали в 2 мл пробирки Eppendorf Safe-Lock™ (022363352). К каждому образцу добавляли приблизительно по 600 мкл бусин Zirconia/Silica диаметром 0,5 мм ("BioSpec Products", Cat. No. 11079105z). Клетки разрушали в бисерной мельнице "Resch MM300" (настройка 20) в течение 5 мин при 4°C в гептане:этилацетате (1:1, объем:объем) и центрифугировали в течение 5 мин. Проводили несколько раундов экстракции до тех пор, пока экстракт не становился бесцветным, что указывало на истощение каротиноидов в образце. Экстракты объединяли после разрушения, упаривали, снова суспендировали в гептане:этилацетате (1:1 объем:объем) и анализировали с помощью HPLC.

Фиг. 1 показывает уровни каротиноидов, изображенные как площадь пика HPLC, в ML2461, трансформированных HSP или HYP, которые управляют экспрессией *crtZ* во встряхиваемых колбах. Поскольку вставка в *Yarrowia* носит случайный характер, хромосомное местоположение варьируется в зависимости от трансформанта. Для того чтобы минимизировать эффекты положения, 10 и 5 трансформантов ана-

лизировали и усредняли для HSP и HYP соответственно.

Пример 4. Получение астаксантина.

Культуры, полученные из трансформантов ML6804, растили, отбирали образцы и экстрагировали, как описано выше. Фиг. 2 показывает уровни каротиноидов, изображенные как площадь пика HPLC, в ML6804, трансформированных промоторами HSP или HYP, которые управляют экспрессией *crtZ*. Показана средняя экспрессия во встряхиваемых колбах 12 трансформантов, каждая для HSP и HYP.

Пример 5. Экспрессия генов в ферментерах для продуцентов астаксантина.

Для того чтобы исследовать экспрессию описанных выше гетерологичных конструкторов в условиях ферментера, астаксантин-продуцирующие штаммы, созданные в примере 4, растили в ферментере, применяя способ с подпиткой, проведенный в 3 л лабораторном ферментаторе. Исходная среда на стадии загрузки партии содержала 10% соевого масла (объем:объем) в качестве основного источника углерода. Во время фазы роста партии уровень биомассы (сухая масса клеток) достигал максимума, и клетки *Yagowia* накапливали большой объем внутренних липидов. После того как исходная партия была израсходована, в ферментере наблюдали быстрый рост уровня растворенного кислорода. В это время начинали подачу соевого масла со скоростью подачи подкормки, контролируемой так, чтобы поддерживать растворенный кислород в ферментере на уровне, равном 20% от насыщения. Отбирали аликвоту, равную 25 мкл, временные точки отбора образцов указаны на фиг. 3, каротиноиды экстрагировали, как описано выше. Для анализа РНК образцы из ферментеров отбирали по одному за раз, чтобы минимизировать время от отбора образцов до замораживания. Образцы отбирали и немедленно помещали на лед. Аликвоты отбирали в трех повторностях и центрифугировали при 13000 rpm в течение 45 с в 2 мл пробирках Eppendorf Safe-Lock™. Супернатант отбрасывали и образец помещали на сухой лед до тех пор, пока все образцы из ферментеров не были отобраны. Образцы хранили при -80°C.

РНК экстрагировали с помощью набора для экстракции РНК "Qiagen RNeasy Mini RNA extraction kit" (Cat. No. 74106), применяя протокол для дрожжей III и измельчение с помощью бусин.

Приблизительно по 600 мкл бусин Zirconia/Silica диаметром 0,5 мм ("BioSpec Products", Cat. No. 11079105z) добавляли к каждому образцу. К образцу добавляли аликвоту буфера RLT с β -МЕ (10 мкл β -МЕ/1 мл RLT), равную 600 мкл. Клетки разрушали в бисерной мельнице "Resch MM300" (настройка 20) в течение 5 мин при 4°C. Образцы центрифугировали 10 с на максимальной скорости и супернатанты переносили в новую пробирку. Образцы повторно центрифугировали на максимальной скорости в течение 2 мин и лизат переносили в новую пробирку. Аликвоту 70%-ного этанола, равную 350 мкл, добавляли к лизату и смешивали пипетированием вверх и вниз. Аликвоту образца, равную 700 мкл, переносили в мини-колонку "RNeasy" и центрифугировали 15 с при 13000 rpm. Проток отбрасывали. Аликвоту буфера RW1, равную 350 мкл, добавляли к колонке, которую центрифугировали 15 с при 13000 rpm. Аликвоту основного раствора ДНКазы I, равную 10 мкл, добавляли к 70 мкл буфера RDD и смешивали, переворачивая пробирку. 80 мкл раствора ДНКазы I добавляли к силикагелевой мембране "RNeasy" и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Аликвоту буфера RW1, равную 350 мкл, добавляли к колонке, и это центрифугировали 15 с при 13000 rpm. Проток отбрасывали. Колонку "RNeasy" переносили в новую 2 мл пробирку для сбора образцов. Для промывки колонки добавляли аликвоту буфера RPE (с этанолом), равную 500 мкл, и это центрифугировали 15 с при 13000 rpm. Проток отбрасывали и предыдущую стадию повторяли. Колонку "RNeasy" помещали в новую 2 мл пробирку для сбора образцов и центрифугировали 1 мин при 13000 rpm, чтобы высушить мембрану. Колонку "RNeasy" помещали в новую 1,5 мл пробирку для сбора образцов. Аликвоту свободной от РНКазы воды, равную 50 мкл, добавляли к мембране и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин. Колонку центрифугировали при 13000 rpm для элюирования.

РНК количественно определяли и тестировали на качество, как описано выше, с помощью биоанализатора "Agilent 2100 BioAnalyzer", применяя набор "Agilent RNA Pico" (Agilent #5067-1513).

Первую цепь кДНК синтезировали, применяя набор VILO Superscript® ("Invitrogen", Cat. No. 11754-250) в соответствии с указаниями производителя. Вкратце, 250 нг РНК инкубировали в 20 мкл реакции с 4 мкл реакционной смеси 5x VILO реакция Mix, 2 мкл ферментной смеси 10x Superscript Enzyme Mix и водой. Реакцию инкубировали при 25°C в течение 10 мин, при 42°C в течение 2 ч и при 85°C в течение 5 мин. Перед проведением количественной ПЦР кДНК разводили до 0,7 нг/мкл.

Праймеры для количественной ПЦР разрабатывали, применяя программное обеспечение PrimerQuest, свободно доступное на веб-сайте IDT, и синтезировали с помощью IDT.

Таблица 3

Праймеры для количественной ПЦР

Ген	<i>Yarrowia</i> ID	Олиго #	Последовательность прямого праймера	Олиго #	Последовательность обратного праймера
<i>ACT1</i>	YALI0D08272g	MO7492	ACGTTGTGCC ATCTACTCTGG TT	MO7493	TCGGCGGAGTTG GTGAAAGAGTAA
<i>TEF1</i>	YALI0C09141g	MO7714	AGTGCGGTGGT ATCGATAAGCG AA	MO7676	TCTCGCTCAGCCT TAAGCTTGTCA
<i>HSP12</i>	YALI0D20526g	MO8241	ACATCTCCGAC GAGAAGAACA AGC	MO8242	AGTTGTTGATGG ACTCCTTGGCCT
<i>HYP1</i>	YALI0D09889g	MO8239	AGTTTGCCCGA CAGAAGGAGA ACA	MO8240	ATGGAGTTGACG GCGAAGATGAGA
<i>crtZ</i>	N/A	MO7655	AGGCTACCTTA AGCGGCTTTAC CA	MO7656	TTCCGGCTTAGCT GCGTAGAGAAA

Количественную ПЦР выполняли, применяя мастер-микс для количественной ПЦР Brilliant III Ultra-Fast SYBER Green® QPCR (Agilent Cat. No. 600883) в термоциклере Stratagene Mx300P. Запускали несколько реакций по 20 мкл. Мастер-микс был создан так, что содержал все компоненты, за исключением кДНК, и 15 мкл аликвоты добавляли к каждой реакции вместе с 5 мкл кДНК. К каждой реакции добавляли по 10 мкл смеси 2x SYBER Mix, 0,3 мкл 500x разбавленного референсного красителя, 0,7 мкл воды и 4 мкл смеси праймеров (2 мкМ каждый прямой и обратный праймер). Также проводили прогоны без обратной транскриптазной реакции (NRT), применяя набор праймеров ACT1 и 0,7 нг/мкл РНК в качестве матрицы. Для каждого планшета проводили реакцию без матрицы (NTC) с 5 мкл воды вместо кДНК. Если для эксперимента запускали несколько планшетов, то также включали межпланшетный калибратор (IPC). Для IPC выбирали единую матрицу и проводили прогоны всех планшетов в трех повторностях с набором праймеров ACT1. Все реакции проводили в трех повторностях. ACT1 был выбран для нормализации количества мРНК, и Tef1 α , конститутивный ген домашнего хозяйства, применяли для расчетов кратности экспрессии.

ddCt вычисляли для удаления варьирования (сред, образца - сред. ACT1). ddCt рассчитывали для нормализации к стандарту, в этом случае TEF1 α , интенсивно экспрессируемому эндогенному гену. ($2^{-(dCt_{\text{образца}} - dCt_{\text{TEF}})}$).

Фиг. 3 показывает уровень экспрессии crtZ, как это отражено в уровнях полученного астаксантина. Фиг. 4 показывает относительную экспрессию crtZ РНК из тех же самых ферментеров, как на фиг. 3, в трех временных точках.

Пример 6. Получение β -галактозидазы.

Для того чтобы оценить экспрессию гена под контролем промоторов HYP и HSP, каждый промотор был функционально слит с геном-репортером lacZ. Плазмиду pMB6149 расщепляли с помощью NheI и HindIII и соответствующий 1 т.п.н. фрагмент промотора NheI-HindIII, описанный в примерах 1 и 2, вставляли для создания pMB6779 (HSPp-lacZ) и pMB6781 (HYPp-lacZ). Культуры, полученные из трансформантов Leu⁺ из ML326, растили в течение ночи в минимальной среде, дополненной урацилом и лизинном, затем разбавляли 1/50 в 10 мл YPD и растили до 2×10^7 клеток/мл. Клетки осаждали и ресуспендировали в 0,5 мл буфера для разрушения (0,1 М Tris pH 8, 20% глицерин объем/объем, 1 мМ ДТТ). Аликвоту, равную 0,25 мл, переносили в свежую пробирку и добавляли 12,5 мкл раствора PMSF (40 мМ в 95%-ном этаноле). Бусины Zirconia/Silica ("BioSpec Products", Cat No.11079105z) добавляли к мениску и пробирку перемешивали на Вортексе 10 мин. Супернатант переносили в свежую пробирку. Раствор центрифугировали на максимальной скорости при 4°C в течение 15 мин. Аликвоту буфера Z, равную 950 мкл, (16 г/л Na₂HPO₄·7H₂O, 5,5 г/л NaH₂PO₄·H₂O, 0,75 г/л KCl, 0,25 г/л MgSO₄·7H₂O, 2,7 мл/л β -меркаптоэтанола) и 50 мкл экстракта объединяли в стеклянной трубке и помещали в водяную баню при 28°C. Реакции начинали добавлением 0,2 мл раствор ONPG (4 мг/мл О-нитрофенил- β -D-галактозида в буфере Z). Реакциям давали возможность протекать до тех пор, пока у среды не развивалась желтая окраска, и останавливали добавлением 0,5 мл 1 М Na₂CO₃. Для каждой реакции регистрировали время и определяли OD₄₂₀. Общий клеточный белок определяли с помощью анализа белка BioRad Protein assay.

Единицы β -галактозидазы = ((OD₄₂₀)(378))/((время в мин)(объем экстракта в мл)(белок мг/мл)).

Фиг. 5 показывает получение β -галактозидазы в 4 и 5 штаммах с HSP или HYP соответственно, которые управляют экспрессией единственной копии lacZ во встряхиваемых колбах.

Список последовательностей

- <110> DSM IP ASSETS B.V.
MCGRATH, Jessica L.
CHEVREUX, Bastien
YORGEY, Peter S.
- <120> ПРОМОТОРЫ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ
ГЕНОВ В ДРОЖЖАХ
- <130> 29003-WO-РСТ
- <140> TBD
<141> 2015-01-29
- <150> 61/933,979
<151> 2014-01-31
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 1002
<212> ДНК
<213> *Yarrowia lipolytica*
- <400> 1
tagtgcaatc acatgttgct actgtacctg ctgtggacca cgcacggcgg aacgtaccgt 60
acaatattt tcttgctcac atgactctct ctcgcccgcg cacgccggtg gcaaattgct 120
cttgacattgg ctctgtctct agacgtccaa accgtccaaa gtggcagggt gacgtgatgc 180
gacgcacgaa ggagatggcc cgggtggcag gaaccggaca cggcgagccg gcgggaaaaa 240
aggcggaaaa cgaaaagcga agggcacaat ctgacggtgc ggctgccacc aaccaagga 300
ggctattttg ggtcgtttc catttcacat tcgccctcaa tggccacttt gcggtggtga 360
acatggtttc tgaacaacc ccccagaatt agagtatatt gatgtgttta agattggggt 420
gctatttggc cattgtgggg gagggtagcg acgtggagga cattccaggg cgaattgagc 480
ctagaaagtg gtaccattcc aaccgtctca gtcgtccgaa ttgatcgcta taactatcac 540
ctctctcaca tgtctacttc cccaaccaac atccccaacc tccccacac taaagttcac 600
gccaataatg taggcaactct ttctgggtgt gggacagcag agcaatacgg aggggagatt 660
acacaacgag ccacaattgg ggagatggta gccatctcac tcgaccgctc gacttttggc 720
aacgtcaat taccaccaaa atttgggctg gagttgaggg gaccgtgttc cagcgctgta 780
ggaccagcaa cacacacggt atcaacagca accaacgccc cgcctaagtc acccagtact 840
gcgcaggtgt gggccaggtg cgttccagat gcgagttggc gaaccctaag cgcacaggtg 900
actttttggg acgggcagta gcaatcgtgg gcggagaccc cgggtgtatat aaaggggtgg 960
agaggacgga ttattagcac caacacacac acttatacta ca 1002
- <210> 2
<211> 995
<212> ДНК
<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 2	
tcgCGgtcag aaggggcagc tctaacgaa gaactgcggt caggtgacac aactttttcc	60
atctcaggggt gtgtcgcgtg tgcttcatcc aaacttttagt tgggggttcgg gttcgcgcga	120
gatgatcacg tgccttgatt tgggtgctgc ccccgctcgcg ctgCGcagct gatttattta	180
tttccgggtg ctgctgtcta cgggggcct tctctgccct tctgtttcaa ccttcggggcg	240
gttctcgtaa ccagcagtag caatccattt cgaactcaa agagctaaaa acgttaaacc	300
tcagcagtcg ctcgacgaat gggctgcggt tgggaagccc acgaggccta tagccagagc	360
ctcgagttga caggagccca gacgcctttt ccaacggcaa cttttatata aaatggcaat	420
gtattcatgc aattgcggcc gtgtcaggtt ggagacactg gaccacactc tccattgctt	480
cctgaggaga tggatcattg ctagtgcacg tacgCGcagc aatcccgcaa gctcGacaac	540
cgtagatggg ctttgggtgg ccaatcaatt acgcaacccg caggttaaat tgtatgagga	600
aggaaggcca cggtagaaag tgggtggtct tcaccagtg gttgttggtg gcgtcatgca	660
gaccatgcat tggggatagc acagggttgg ggtgtcttgt ggactcaatg ggtgaaagga	720
gatggaaaag ggcggtgaaa agtggtagaa tcgaaatccc tgacgtcaat ttataaagta	780
aaatgcgttt ctgccatttt gctcccctcc ttctttcgca atcgccctcc caaaagtgtg	840
cgtggcagta cacatgcttg catacaatga agctaaccg gcttgctcag tagttgctat	900
atccaggcat ggtgtgaaac ccctcaaagt atatatagga gcggtgagcc ccagctctggg	960
gtctttttct tccatctcaa aactactttc tcaca	995

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, включающая:
 - а) полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; или
 - б) нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 в жестких условиях, где указанные фрагменты или полинуклеотидные последовательности используются для регуляции экспрессии гена в дрожжах.
2. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая имеет по меньшей мере 95% идентичность с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.
3. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, которую применяют для регуляции экспрессии гена в микроорганизме рода *Yarrowia*.
4. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.3, где указанный ген гетерологичен микроорганизму рода *Yarrowia*.
5. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, которая функционально связана с геном, кодирующим белок.
6. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.5, где указанный ген выбирают из группы нуклеиновых кислот, кодирующих белок из:
 - (а) биосинтетического пути органических кислот,
 - (б) биосинтетического пути липидов и жирных кислот,
 - (с) биосинтетического пути диолов,
 - (d) биосинтетического пути ароматических соединений,
 - (е) биосинтетического пути витаминов или
 - (f) биосинтетического пути каротеноидов, особенно кетокаротеноидов.
7. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты является вектором.
8. Генетически модифицированный микроорганизм, включающий рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов.
9. Генетически модифицированный микроорганизм по п.8, где микроорганизм является представителем рода *Yarrowia*.
10. Генетически модифицированный микроорганизм по п.9, где указанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты применяют для регуляции экспрессии одного или нескольких генов в указанном микроорганизме и в котором скорость экспрессии по меньшей мере указанного одного или нескольких генов увеличивается по сравнению с диким типом.
11. Генетически модифицированный микроорганизм по п.10, где регуляцию экспрессии гена достигают с помощью:
 - (а) введения одной или нескольких указанных рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты в геном указанного микроорганизма, для того чтобы экспрессия одного или нескольких эндогенных генов

указанного микроорганизма находилась под контролем введенной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты;

(b) введения одного или нескольких генов в геном указанного микроорганизма, для того чтобы экспрессия одного или нескольких введенных генов находилась под контролем указанной рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, которая эндогенна указанному микроорганизму; или

(c) введения одного или нескольких конструктов нуклеиновых кислот в указанный микроорганизм, в котором указанный один или нескольких конструктов нуклеиновых кислот включают по меньшей мере одну указанную рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты и указанная рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с одним или несколькими генами, которые будут экспрессированы.

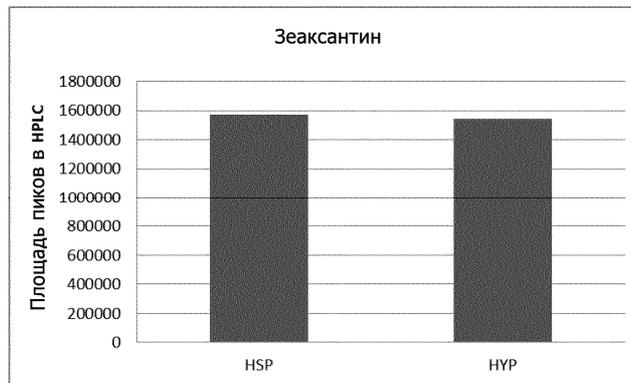
12. Способ получения биосинтетического продукта, включающий:

(a) культивирование генетически модифицированного микроорганизма рода *Yarrowia* в среде, где генетически модифицированный микроорганизм включает рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.7;

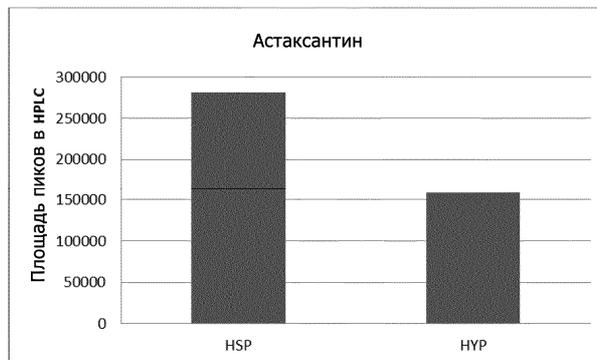
(b) продуцирование биосинтетического продукта и

(c) выделение биосинтетического продукта, полученного на стадии (b).

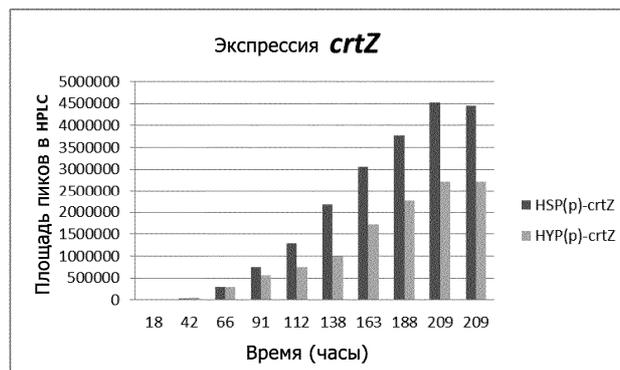
13. Способ по п.12, где указанный биосинтетический продукт является каратеноидом.



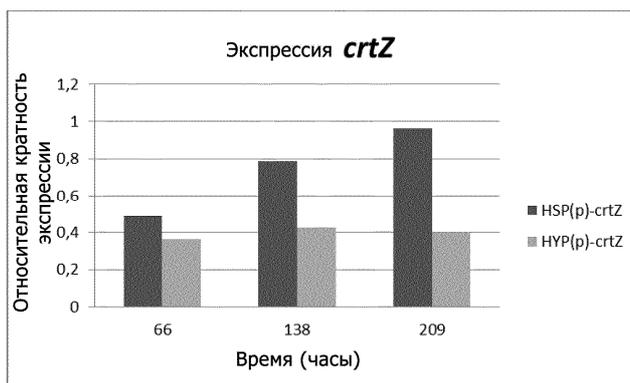
Фиг. 1



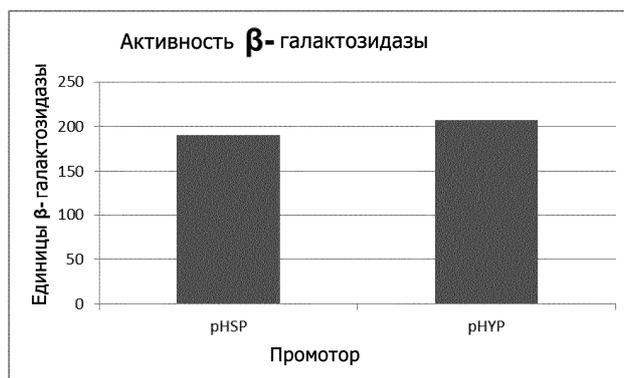
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

