



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 127**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06704721 .7**

96 Fecha de presentación : **23.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1851312**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Promotores mutantes de AOX1.**

30 Prioridad: **23.02.2005 AT A 304/2005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

73 Titular/es: **Technische Universität Graz**
Rechbauerstrasse, 12
8010 Graz, AT
VTU HOLDING GmbH

72 Inventor/es: **Hartner, Franz y**
Glieder, Anton

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Promotores mutantes de AOX1.

La presente invención se refiere a promotores mutantes de AOX1 de *Pichia pastoris*.

S. cerevisiae ha dominado (y aún domina) el uso científico y biotecnológico como organismo modelo eucariota y sistema de producción. En el siglo pasado otra levadura ganó gran atracción: la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Debido a su cualidad de reproducirse únicamente mediante fisión, *S. pombe* recibió excelente atención como organismo modelo y actualmente, junto con *S. cerevisiae*, es la especie de levadura más intensamente estudiada, en cuanto a genética molecular y biología celular. Entre más de 700 especies de levaduras diferentes conocidas hasta la fecha, las dos levaduras mencionadas anteriormente pueden proporcionar solamente una serie limitada de cualidades interesantes para aplicaciones tecnológicas y científicas. Desde los años 1970 ó 1980 se investigaron cada vez más especies de levaduras con características sobresalientes para biotecnología e investigación. Estas levaduras, denominadas no-convencionales (NCY) o levaduras no-*Saccharomyces* (en este caso el término *Saccharomyces* incluye a la levadura *Schizosaccharomyces pombe*) se desarrollan por varias razones: poseen importancia médica, como *Candida albicans*, o relevancia tecnológica, como *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, pueden crecer sobre sustratos particulares (por ejemplo, n-alcanos, lactosa). Por ejemplo, el patógeno fúngico de seres humanos más común, *C. albicans* se ha estudiado ampliamente ya que revela la naturaleza de los factores de virulencia implicados en la patogenicia, convirtiéndose, por tanto, en el organismo modelo para levaduras patógenas. Otro grupo bien establecido de NCY son las levaduras metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) que son superiores a *S. cerevisiae* en cuanto a producción de proteínas recombinantes y estudios de biogénesis de peroxisomas. Estos son sólo los miembros más destacados de levaduras no-convencionales que siguen teniendo atracción académica o tecnológica. Hasta la fecha otras muchas especies también tienen particular interés y este grupo crecerá rápidamente en los próximos años.

Todas las levaduras conocidas utilizan azúcares, la clase más abundante de moléculas en la naturaleza. Aunque existen grandes diferencias en cuanto a la aceptación del sustrato de una especie a otra (véase la Tabla 1), la transformación de glucosa 6-fosfato o fructosa 6-fosfato a piruvato es un tema común en su metabolismo. De todos modos, el equipo enzimático de la ruta glucolítica varía significativamente entre las diferentes levaduras. Mientras que en *S. cerevisiae*, la mayoría de las enzimas se conocen y se caracterizan, al menos parcialmente, sólo unas pocas enzimas se describen en las NCY. Algunas de las funciones necesarias para la glucólisis están mediadas por varios genes/enzimas en algunas levaduras, especialmente aquellas que desempeñan un papel adicional en el control o en la regulación del metabolismo y/o que son un punto de ramificación como glucoquinasa/hexoquinasa, fosfofructoquinasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Normalmente, las isoenzimas se regulan diferencialmente lo que indica diversas funciones en requisitos previos ambientales cambiantes. Algunos de los genes que codifican enzimas glucolíticas son constitutivos y están sumamente expresados, por ejemplo, el gen de *PGK1* (fosfoglicerato quinasa) de *S. cerevisiae* o el gen de *GAP* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *P. pastoris*, mientras que otras enzimas se regulan rigurosamente como el gen de *ENO1* (enolasa) de *S. cerevisiae*.

TABLA 1

Levaduras de interés biotecnológico seleccionadas con sustratos comerciales relevantes distintos de glucosa y fructosa

Levadura	Metabolismo energético	Sustratos seleccionados
<i>S. cerevisiae</i>	Crabtree positiva	sacarosa, maltosa, rafinosa, etanol
<i>S. pombe</i>	Crabtree positiva	sacarosa, maltosa, rafinosa
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Crabtree positiva	ácido acético, etanol, glicerol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Crabtree negativa	n-alcanos, ácidos grasos, etanol
<i>Pichia stipitis</i>	Crabtree negativa	xilosa
<i>Pichia pastoris</i>	Crabtree negativa	metanol, glicerol
<i>Hansenula polymorpha</i>	Crabtree negativa	metanol, glicerol

Levadura	Metabolismo energético	Sustratos seleccionados
<i>Schwanninomyces occidentalis</i>	Crabtree negativa	almidón, n-alcanos, xilosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa, lactosa, etanol
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Crabtree negativa	lactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, etanol, glicerol, xilitol, lactato

En el metabolismo, el destino del piruvato varía significativamente entre especies de levaduras y condiciones de cultivo. En *S. cerevisiae* y otras levaduras denominadas Crabtree positivas, la respiración se inhibe por glucosa y azúcares relacionados. Esto conduce a la transformación del piruvato, mediante la piruvato descarboxilasa, en etanol y en CO₂, incluso con grandes cantidades de oxígeno, lo que también se conoce como fermentación. En las levaduras Crabtree negativas, a las que pertenecen la mayoría de las NCY, la transformación del piruvato en etanol se produce sólo en condiciones anaerobias. En condiciones aerobias, el piruvato se oxida a CO₂ mediante la piruvato deshidrogenasa y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El ciclo del TCA es de interés excepcional para el metabolismo celular debido al hecho de que es el único modo de realizar la oxidación de los azúcares a CO₂. La oxidación a CO₂ da como resultado la producción de NADH, que se usa para la producción de energía. Además los productos intermedios del ciclo del TCA son las principales fuentes de metabolitos para fines biosintéticos. Debido a la eliminación de los productos intermedios, el ciclo del TCA debe reponerse para mantenerlo en funcionamiento. Las principales reacciones anapleróticas en levaduras son el ciclo de la piruvato carboxilasa y el del glioxilato. El primero es la ruta principal cuando se cultivan en amonio como única fuente de nitrógeno mientras que el segundo es necesario cuando se cultivan en fuentes de carbono con menos de 3 átomos de carbono. A diferencia de este notable interés, se sabe muy poco sobre los genes o las enzimas que participan en el ciclo del TCA en las NCY. El NADH generado por las reacciones catabólicas, tanto en el citosol como en las mitocondrias, tiene que re-oxidarse a NAD⁺ para mantener en funcionamiento a las reacciones. En levaduras Crabtree negativas (por ejemplo, *Pichia pastoris*) en condiciones aerobias, el NADH se re-oxida, principalmente, a través de la cadena respiratoria. La situación es significativamente diferente en levaduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, en las que existe conjuntamente la respiración y la fermentación. Cuando se cultivan en glucosa en condiciones aerobias, la glucosa reprime la respiración y se produce la fermentación. En estas condiciones el NAD⁺ se regenera por la formación de etanol (el NADH producido por glucólisis) o glicerol. La respiración en levaduras difiere del paradigma de esta ruta en animales, como se describe en cada libro de texto de bioquímica. En primer lugar, algunas levaduras, como *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, carecen de complejo I de la cadena respiratoria. En estas levaduras la regeneración del NAD⁺ se realiza sin bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna por NADH deshidrogenasas externas e internas. La segunda diferencia principal, observada en las levaduras Crabtree negativas, hongos y plantas, es una ruta de respiración alternativa en paralelo al complejo III y IV de la cadena del citocromo. Esta respiración alternativa está mediada por una oxidasa denominada alternativa que transfiere electrones directamente desde la reserva de ubiquinona al oxígeno sin bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

EL NADPH se produce, con fines biosintéticos, en la parte oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato (PPP). Otros metabolitos muy importantes proporcionados por esta ruta son, ribosa 5-fosfato y eritrosa 4-fosfato, necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y cofactores de nucleótidos y para la síntesis de aminoácidos aromáticos, respectivamente. Todavía quedan muchas lagunas en cuanto a la información sobre los genes y sus correspondientes enzimas implicadas en la PPP en levaduras no convencionales. Se aislaron algunas enzimas de *Candida utilis*, *S. pombe* y *K. lactis*. La caracterización en cuanto a composición y cinética reveló varias diferencias entre estas enzimas. Debido a la falta de información no puede calcularse la influencia sobre la PPP en estas levaduras, pero se ha observado que, por ejemplo, mutantes de fosfoglucosa isomerasa de *K. lactis*, que carecen de glucólisis, pueden cultivarse en medios con glucosa, a diferencia de *S. cerevisiae*. Esta observación indica que la capacidad de la ruta de la pentosa fosfato en *K. lactis* es suficiente para el cultivo en glucosa como fuente de carbono. En levaduras metilotróficas, pudo encontrarse una transketolasa adicional (dihidroxiacetona sintasa). Esta enzima se localiza en los peroxisomas y confiere la asimilación de formaldehído en el metabolismo celular por condensación con xilulosa 5-fosfato con formación de dihidroxiacetona y gliceraldehído 3-fosfato.

Las levaduras, como organismos eucariotas unicelulares, proporcionan sistemas de expresión atractivos para la producción de proteínas recombinantes. Combinan los *pros* de las bacterias, como técnicas de manipulación genética bien desarrolladas, técnicas de cultivo sencillas, seguras y por lo tanto asequibles (a gran escala), con el beneficio principal de los sistemas de expresión eucariotas, concretamente el procesamiento de proteínas eucariotas. Debido a las razones mencionadas anteriormente, *S. cerevisiae* ha dominado este campo durante muchos años, dando lugar a un gran número de proteínas (por ejemplo, insulina, HBsAg, HSA) producidas en este organismo. *S. cerevisiae* muestra algunas limitaciones debido a la hiperglucosilación, retención de proteínas secretadas en el espacio periplásmico, inestabilidad plasmídica y productos de bajo rendimiento. Para superar las limitaciones de este sencillo organismo, se desarrolló un

pequeño conjunto de levaduras no convencionales como hospedadoras para la expresión de genes heterólogos. Entre otras, se usaron *K. lactis*, *Y. lipolytica* y las levaduras metilotróficas *Candida boidinii*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*, pero sólo las 2 últimas especies obtuvieron destacado interés comercial. *Schizosaccharomyces pombe* presenta algunas características muy próximas a las de eucariotas superiores lo que hace que esta levadura sea un hospedador muy atractivo para la producción de proteínas heterólogas: (1) el mecanismo de iniciación de la transcripción es más parecido al de eucariotas superiores, (2) algunos promotores de mamíferos son funcionales en *S. pombe*, (3) la capacidad de corte y empalme del ARN, destacando en una similitud de componentes del espliceosoma con los de mamíferos, (4) puede reconocerse la señal de retención del retículo endoplásmico KDEL de mamíferos, (5) la existencia de restos de galactosa en glicoproteínas y (6) algunas otras modificaciones postraduccionales, como acetilación e isoprenilación de proteínas se realizan de un modo más parecido a las de las células de mamíferos que a las de levaduras. Varias de las características mencionadas anteriormente podrían aumentar la importancia de *S. pombe* en la producción de proteínas recombinantes en el futuro próximo en lo que respecta a la producción de proteínas heterólogas auténticas y aplicaciones de alto rendimiento de las mismas, como genómica estructural y funcional.

Todos los microorganismos poseen mecanismos para adaptar su metabolismo a la utilización óptima de los nutrientes disponibles en el entorno. La adaptación rápida y correcta a estas limitaciones del entorno son los principales factores en el control del crecimiento y otros parámetros fisiológicos de todos los organismos. Para las levaduras, así como para la mayoría de microorganismos, la glucosa es la fuente de carbono y de energía preferida. Por lo tanto, no resulta sorprendente que la glucosa, el monosacárido más abundante en la naturaleza, sea un mensajero principal para las células que influyen en el crecimiento y desarrollo de estos organismos por regulación de la expresión génica, principalmente, pero no exclusivamente, a nivel del control transcripcional. Mediante análisis de transcripción genómica se reveló que, una considerable cantidad de genes se regulan por el nivel de glucosa determinado por el entorno. Los genes con función metabólica conocida en cuanto a la utilización de glucosa, como transportadores de glucosa de baja afinidad y enzimas glucolíticas así como genes que codifican proteínas ribosomales, se inducen por glucosa. Por otro lado, la glucosa reprime una amplia serie de genes, incluidos genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono, gluconeogénesis, el ciclo del glioxilato, funciones peroxisomales y respiración. La represión de la respiración (efecto Crabtree) se produce sólo en unas pocas especies de levaduras (levaduras fermentativas, Crabtree positivas) como *Saccharomyces cerevisiae* mientras que en la mayoría de las especies de levadura la glucosa no reprime la respiración (Crabtree negativas). Aunque en los últimos 20 años se consiguió un amplio conocimiento sobre la maquinaria de represión de la glucosa, basada principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, su mecanismo real, especialmente las partes aguas arriba de detección y señalización de la glucosa, no se comprende completamente. Sin embargo, para obtener una mejor comprensión del presente documento, a continuación se describen brevemente algunos de los principales actores de la represión por el catabolito de carbono como se describe para *S. cerevisiae*.

El gen de *SNF1* que codifica una Ser/Tre proteína quinasa puede encontrarse en complejos de elevada masa molecular en células de levaduras. Este gen se regula por cambios conformacionales dentro del complejo producidos por fosforilación en la subunidad reguladora de Snf1p. Hasta ahora, se han identificado 3 quinasas aguas arriba (Pak1p, Elm1p y Tos3p) para fosforilar y, por lo tanto, activar la Snf1p. Su actividad es absolutamente necesaria para la desrepresión de una amplia diversidad de genes reprimidos por glucosa. Por lo tanto no es sorprendente que el Snf1p u homólogos estén ampliamente conservados en eucariotas.

La proteína de dedo de cinc Mig1p puede unirse a regiones promotoras de una amplia diversidad de genes reprimidos por glucosa. Esta actúa, más probablemente, reclutando al complejo represor general Ssn6(Cyc8)-Tup1p. La proteína quinasa Snf1, controla la función de Mig1p, sin embargo, no hay una prueba clara de una fosforilación directa. Mig1p se localiza en el núcleo en su forma no fosforilada. El agotamiento de glucosa produce la fosforilación de Mig1p seguido de translocación al citoplasma. Cuando se añade glucosa a las células, Mig1p retrocede rápidamente al núcleo y reprime la transcripción.

La Adr1p también pertenece a la familia de proteínas de dedo de cinc y resultó ser un efector positivo de proteínas peroxisomales y del gen *ADH2*, que codifica la alcohol deshidrogenasa II reprimida por glucosa. La glucosa regula negativamente la expresión de *ADR1* mediante la proteína quinasa dependiente del AMP cíclico (AMPC) a niveles elevados de AMPC. El principal efecto regulador aparece a nivel de la traducción del ARNm, pero también se observaron efectos reguladores en la transcripción, así como estabilidad del ARNm, dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* analizada.

Para un gran número de genes, incluyendo muchos de los genes implicados en el metabolismo respiratorio, la transcripción se activa sobre fuentes de carbono no fermentables mediante el complejo Hap2/3/4/5. Para algunos genes implicados en la respiración como *CYC1* (que codifica el citocromo c-iso-1) y *COX6* (subunidad VI del citocromo c oxidasa) se ha establecido que Snf1 es necesario para la desrepresión después del crecimiento sobre glucosa. La transcripción de *HAP4* se reprime cuando la glucosa está presente, no obstante, no puede demostrarse una participación directa de Hap4p o Snf1p en la desrepresión.

La Gcr1p es una proteína principal activadora de la transcripción de genes glucolíticos (por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). La Gcr1p, junto con el factor general de la transcripción Rap1p, es el elemento principal de la expresión de genes glucolíticos, con respecto a la coordinación de la transcripción y es absolutamente necesaria para la expresión a alto nivel. El patrón de expresión genómica del mutante *gcr1* de *S. cerevisiae* y de tipo silvestre, que crecen en diversas fuentes de carbono, reveló 53 fases de lectura abiertas (ORF), incluyendo genes de la glucólisis, como dependientes de Gcr1p.

Esta descripción de algunos factores de transcripción y de la ruta de Snf1p y Mig1p debe proporcionar una breve visión de conjunto de algunos participantes en el circuito de represión de la glucosa. Debe tenerse en cuenta que existen más ciclos reguladores que la ruta de Snf1p para la represión de la glucosa. Aunque en los últimos 20 años se ha logrado un amplio conocimiento sobre la detección y señalización de glucosa, importantes cuestiones continúan sin respuestas: cuál es la naturaleza de la señal de la glucosa y cómo se regulan e integran las rutas de señalización conocidas.

Un número limitado de especies de levadura puede crecer en metanol como única fuente de carbono y energía. Estas pertenecen a uno de los cuatro géneros de *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* y *Torulopsis* y comparten una ruta general de utilización del metanol que se expresa después de la desrepresión o inducción con metanol (véase 1.3.1). Dado que las reacciones iniciales de esta ruta se encuentran compartimentalizadas en el interior de los peroxisomas, estos orgánulos también están inducidos. Debido a la fuerte inducción de los peroxisomas, las levaduras *Candida boidinii*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* se usaron frecuentemente en biología celular para estudiar la biogénesis y función de los peroxisomas.

Como se ha mencionado anteriormente, las levaduras metilotróficas comparten una ruta común de utilización de metanol. La primera etapa es la oxidación del metanol a formaldehído y a peróxido de hidrógeno, catalizada por alcohol oxidasas (AOX, CE 1.1.3.13). El H_2O_2 tóxico se descompone en oxígeno y agua por la acción de catalasa. Ambas enzimas están secuestradas en el interior de los peroxisomas. El formaldehído se oxida mediante dos reacciones de deshidrogenasa posteriores o se asimila en el metabolismo celular por la condensación con xilulosa 5-fosfato (Xu5P). El formaldehído se oxida a formiato y adicionalmente a dióxido de carbono mediante una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (GSH) y una formiato deshidrogenasa, ambas localizadas en el citosol. El NADH, generado en ambas reacciones, se usa para producir energía para el crecimiento en metanol. La reacción de condensación tiene lugar en el interior de los peroxisomas y se cataliza mediante la transcetolasa dihidroxiacetona sintasa mencionada anteriormente. Los compuestos de C3 resultantes, la dihidroxiacetona (DHA) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) se metabolizan adicionalmente en el citosol. Después de una fosforilación de la DHA, se forma la fructosa 1, 6-bisfosfato (FBP) por una reacción aldolasa de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y GAP. La FBP se transforma en fructosa-6-fosfato por una fosfatasa y la xilulosa 5-fosfato (Xu5P) se regenera en la ruta de la pentosa fosfato. Un tercio del GAP generado entra en la ruta de la gluconeogénesis para la síntesis de los constituyentes celulares.

Las enzimas clave de la ruta de utilización del metanol, alcohol oxidasa y formiato deshidrogenasa, se producen a niveles muy elevados después de inducción con metanol. La alcohol oxidasa puede representar más del 30% de la proteína soluble total, la dihidroxiacetona sintasa y la formiato deshidrogenasa hasta un 20%. Los peroxisomas, que también están inducidos, pueden representar aproximadamente el 80% del volumen celular. Para la producción de proteínas recombinantes, se desarrollaron secuencias promotoras de varios genes de utilización de metanol. Entre otras, estos promotores fuertes y inducibles son una razón principal para el amplio uso de *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* como hospedadoras para la producción de proteínas.

En *H. polymorpha* y en *C. boidinii* un gen codifica una alcohol oxidasa: *MOX* (metanol oxidasa, *H. polymorpha*) y *AOD1* (alcohol oxidasa, *C. boidinii*). Se encontraron 2 genes en las dos especies de *Pichia*, *P. pastoris* (*AOX1* y *AOX2*) y *P. methanolica* (*AUG1* y *AUG2*, genes que utilizan alcohol, o *MOD1* y *MOD2*), siendo *Aox1p* y *Aug1p* las alcohol oxidasa principales. La comparación de regiones codificantes reveló una similitud del 73-85% a nivel de aminoácidos entre las levaduras metilotróficas [1]. La homología entre las ORF (fases de lectura abiertas) de *AOX1* y de *AOX2* de *P. pastoris* es del 92% y del 97% a nivel de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, respectivamente [2, 3]. La alcohol oxidasa es una flavoproteína octamérica que contiene FAD unido no covalentemente o un análogo modificado (FADm) por subunidad. La traducción de AOX se produce en los ribosomas libres, seguido de una importación postraduccional dentro de los peroxisomas. La translocación dentro de los peroxisomas está dirigida por una secuencia PTS1 (señal de dirección peroxisomal de tipo 1) en su extremo C-terminal. Los oligómeros de Aox se forman sólo después de la importación en la matriz peroxisomal.

Ni en *C. boidinii* ni en *P. pastoris* pudieron encontrarse oligómeros de Aox en el citosol a diferencia de la dihidroxiacetona sintasa, que forma un dímero en el citosol antes de su translocación dentro de la matriz peroxisomal. La secuencia promotora de la alcohol oxidasa 1 de *Pichia pastoris*, no solo tiene interés biotecnológico, sino también la enzima debido a una amplia variedad de sustratos (alcoholes primarios insaturados y saturados con longitud de cadena de corta a moderada) y a una alta estabilidad en diversas condiciones de reacción. La regulación de todos los genes de alcohol oxidasa se produce a nivel de la transcripción y, más probablemente, en la fase del inicio de la transcripción. Aunque *AOX1* y *AOX2* se regulan de manera similar (ARNm no detectable en glicerol o glucosa, detectable en la fase de privación de carbono, elevadas cantidades en metanol), sus 5 regiones flanqueantes no comparten homología significativa [2, 4].

Cada locus de AOX presenta un supuesto sitio de unión a la ARN polimerasa (TATAAA; caja de Goldberg-Hogness o TATA) en la posición -43 en relación con el sitio de inicio de la transcripción primario. Las dos secuencias líder de ARNm de AOX de *P. pastoris*, son extremadamente ricas en restos A e inusualmente largas para levaduras (115 nucleótidos (nt) para *AOX1* y 160 nt para *AOX2*). Las regiones de inicio de la traducción alrededor del codón de inicio ATG (secuencia de Kozak; *AOX1*: CGAAACG ATG GCT, *AOX2*: GAGAAAA ATG GCC) concuerdan con las secuencias consenso descritas anteriormente para *S. cerevisiae* y eucariotas superiores. Aún no se conoce la función fisiológica del segundo gen de la alcohol oxidasa en *P. pastoris* y en *P. methanolica*. La alteración de *AOX1* o *AUG1* produce graves defectos en el crecimiento en estas cepas (el denominado fenotipo de utilización lenta de metanol

(Mut^s)) mientras que las cepas *aox2* y *aug2* muestran tasas de crecimiento comparables con respecto a la cepa de tipo silvestre. Se observaron 9 formas múltiples de la alcohol oxidasa en *P. methanolica*, representando una oligomerización aleatoria de los 2 productos génicos *Aug1p* y *Aug2p*. *AUG1* y *AUG2* se regulan de un modo diferente: *Aug1p* solo puede detectarse con privación de carbono y a concentración baja de metanol y con el aumento de la concentración de metanol la proporción de *Aug2p* con respecto a *Aug1p* aumenta. El desplazamiento a octámeros con elevado contenido de *Aug2p* es debido a un aumento en la expresión de *AUG2*, regulado a nivel de la transcripción. Los valores de *K_m* para el metanol de los dos homo octámeros de *Aug1p* y *Aug2p* son aproximadamente de 0,56 y 5,6 mM, respectivamente. Junto con el hallazgo, esta alteración de *AUG1* produce un defecto en el crecimiento a concentraciones bajas de metanol [5], estos resultados implican que *AUG2* es una ventaja para *P. methanolica* cuando crece con elevadas concentraciones de metanol. En *Pichia pastoris* ni se analizó la función del gen *AOX2* con más detalle, ni se encontraron condiciones favorables para poseer un segundo gen de alcohol oxidasa. Dado que las condiciones de laboratorio representan sólo una fracción muy pequeña de las condiciones no parasíticas a las que se enfrentan los microorganismos, debería haber situaciones en la naturaleza en las que el gen *AOX2* fuera de importancia selectiva para *P. pastoris*.

La expresión de *AOD1* en *C. boidinii* y de *MOX* en *H. polymorpha* se reprime rigurosamente durante el crecimiento en glucosa o en etanol como única fuente de carbono, se desreprime en glicerol y se induce fuertemente en metanol. La expresión de estas dos enzimas también se reprime cuando en el medio están presentes la glucosa y el metanol. Si el glicerol está presente el metanol puede inducir la expresión génica. La transcripción de *AOD1* y *MOX* también se desreprime con privación de carbono y se reprime cuando el etanol está presente [6-9]. Dos mecanismos reguladores distintos son los responsables de la represión del metabolismo de utilización de metanol por etanol o glucosa [10, 11]. En *Pichia pastoris* la situación es significativamente diferente: *AOX1* se reprime cuando la glucosa, el etanol o el glicerol están presentes en los medios (en concentraciones limitantes sin crecimiento). La desrepresión con privación de carbono e inducción por metanol es similar para *AOD1* y *MOX*. Las fuentes de carbono con las que se desreprime la expresión de *AOX1*, son, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa y alanina [12].

Después del cambio de metanol a una fuente de carbono de represión como la glucosa o el etanol, los peroxisomas se degradan en horas durante la adaptación a la nueva fuente de carbono. La degradación proteolítica en la vacuola de la levadura sigue, de nuevo, dos mecanismos distintos cuando se adapta a la glucosa o al etanol, denominados micro- y macro-autofagia, respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente, las levaduras metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* se usan ampliamente para la producción de proteínas recombinantes. Hasta ahora, se han producido más de 500 proteínas en *P. pastoris*. Su desarrollo fue impulsado por algunas características, que las aporta ventajas entre los hospedadores de expresión recombinante: 1) comparten las ventajas generales de las levaduras en cuanto a manipulación genética y a tecnología de cultivo y (en el laboratorio y a gran escala); 2) la capacidad de crecer a densidades celulares extremadamente altas; y 3) el alto nivel de producción de proteína recombinante (secretada o intracelular). Para la producción de proteínas recombinantes, se desarrollaron fuertes promotores inducibles de genes que codifican las reacciones de la ruta de utilización del metanol. Las más ampliamente usadas son las regiones promotoras de los genes de alcohol oxidasa *AOX1* y *MOX* de *P. pastoris* y *H. polymorpha*, respectivamente. Pero también se usaron otras regiones promotoras de los genes de la ruta de utilización de metanol para impulsar la producción de proteínas recombinantes: promotores de FMD (formiato deshidrogenasa) y *DAS1* (dihidroxiacetona sintasa) en *H. polymorpha* y en *C. boidinii* y el promotor *FLD1* (formaldehído deshidrogenasa) en *P. pastoris*. Este último también puede inducirse con metilamina como única fuente de nitrógeno con la glucosa como una fuente de carbono. También están disponibles promotores para la expresión constitutiva de genes extraños: el elemento promotor de GAP (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) en *P. pastoris* y el promotor de PMA1 (que codifica la H⁺ ATPasa de la membrana plasmática) en *H. polymorpha*. Se desarrollaron varias combinaciones de cepa hospedadora auxotrófica/gen marcador para *P. pastoris* (por ejemplo, *HIS4*) y *H. polymorpha* (por ejemplo, *LEU2* y *URA3*). También se encuentran disponibles marcadores de selección dominantes (por ejemplo, ZeocinTM, resistencia a G418). La integración de genes en levaduras metilotróficas se realiza principalmente (si no exclusivamente) por integración de homólogos. También se encuentran disponibles vectores que llevan una región ARS (secuencia autónomamente replicante), pero por lo general son bastante inestables si se libera presión de selección lo que provoca su aplicación tecnológica limitada. En *P. pastoris*, el gen extraño está integrado específicamente en el sitio en el locus de *AOX1* o en el de *HIS4*. Otros posibles sitios de integración son, por ejemplo, el locus de GAP (para la expresión de *AOX1*) o cualquier otro locus marcador de selección (por ejemplo, *ADE1*, *URA3*, *ARG4* y *LEU2*). En *H. polymorpha*, los casetes de expresión se integran al azar en una disposición de cabeza a cola, dando lugar a integrantes mitóticamente estables con un elevado número de copias (hasta 100). Sin embargo, a menudo un elevado número de copias no da como resultado una expresión de alto nivel. Son factores adicionales de gran influencia: la estructura del casete de integración, la naturaleza y la estructura de la proteína a expresar y el sitio de integración. Especialmente la estructura del casete de integración es de gran influencia sobre el efecto de dosificación de genes. En [13, 14] se proporciona una exposición adicional de cómo optimizar el casete de expresión y la dosificación de genes. Las levaduras metilotróficas pertenecen al grupo de levaduras Crabtree negativas, de manera que la producción de etanol se produce a un nivel muy bajo, cuando crecen en condiciones aerobias. Debido a esto, estas levaduras pueden crecer a densidades celulares muy altas en cultivos de fermentación, dando como resultado productos alto rendimiento. La producción de proteínas impulsada por *AOX1* puede aumentarse 3-5 veces más cuando la concentración de metanol en el biorreactor está en esferas de crecimiento limitado. El hecho de que *P. pastoris* secreta, en condiciones convencionales, sólo bajas cantidades de proteínas endógenas, hace que cada proteína recombinante secretada en el medio sea más abundante. La secreción puede servir como una primera etapa sustancial en el proceso de purificación aguas abajo. Para la secreción de proteínas, en *P. pastoris* y *H. polymorpha*, se usa ampliamente la secuencia prepro líder MF α 1 (factor de apareamiento α) de *S. cerevisiae* y las secuencias derivadas de la fosfatasa ácida (*PHO1*). En

algunos casos se obtuvo secreción suficiente con proteínas de plantas, hongos y mamíferos que llevan sus señales de secreción naturales. Como se ha mencionado anteriormente, las levaduras pueden realizar modificaciones postraduccionales como la formación de enlaces disulfuro, procesamiento de secuencias de señal (por ejemplo, la secuencia prepro líder de MF α 1), adición de lípidos y glucosilación asociada a N- y O-. Mientras que en células de mamíferos, se producen estructuras de oligosacáridos asociadas a N- y O- altamente complejas, compuestas por una diversidad de azúcares (por ejemplo, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico), la mayoría de las levaduras generan estructuras de tipo manosa superior que carecen de algunas entidades de azúcar como galactosa o ácido siálico. Estas estructuras de tipo no-mamífero pueden causar graves problemas de aplicación terapéutica debido principalmente a su alto potencial de inmunogenicidad. En *H. polymorpha* y *P. pastoris*, a diferencia de *S. cerevisiae*, la hipermanosilación es menos abundante y no se incorporan manosas asociadas a terminales hiper-inmunogénicas α -1, 3 en oligosacáridos asociados a N. Para superar los problemas de inmunogenicidad (y algunos otros como baja estabilidad en el flujo sanguíneo) se han realizado esfuerzos sobre como humanizar estructuras de oligosacáridos derivadas de levaduras y especialmente, como pone de manifiesto la bibliografía reciente, en *P. pastoris*. Hasta ahora, la inmensa mayoría de artículos de investigación y procesos comerciales se basan en la famosa levadura *S. cerevisiae*. Debido al mayor conocimiento sobre las levaduras no convencionales, junto con las apreciables ventajas en cuanto a fermentación a gran escala y elementos de glucosilación, *H. polymorpha* y *P. pastoris* se están convirtiendo rápidamente en las levaduras de elección. Esto se destaca por el hecho de que varios de los procesos de producción se aplicaron en la industria.

En el documento WO 02/081650 se describe la identificación de las regiones promotoras de *AOX1*, que pueden usarse para la construcción de promotores mutantes de *AOX1*. Dado que las regiones de secuencias deletionadas del promotor de *AOX1* descritas en el mismo son muy largas, pudo observarse el efecto acumulado y no los efectos individuales de las distintas secuencias reguladoras del promotor. Sin embargo, dicha estrategia no permitirá el desarrollo de promotores fuertemente mejorados. Especialmente, cuando se construyen nuevos promotores, con características mejoradas, deletionando o duplicando partes del promotor original, es necesario conocer el intervalo exacto de la secuencia reguladora.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un promotor de *AOX1* mejorado, con propiedades potenciadas, con el fin de facilitar el procesamiento, aguas abajo, en la producción de proteínas, aumentar los rendimientos de espacio-tiempo y ayudar a enriquecer la calidad de los productos.

Otro objeto es proporcionar un fuerte promotor de *AOX1* en un vector o en una cepa hospedadora que anticipe parcial o totalmente la represión de glucosa. Tener un promotor que impulse una fuerte expresión en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, es una ventaja.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un promotor de *AOX1* que permita la producción de una proteína sin metanol o empleando una cantidad de metanol reducida. Dichos promotores tendrían un impacto significativo en los procesos de producción industrial. Por cuestiones de seguridad se necesitan equipos especiales para las plantas de producción que emplean metanol como un inductor. Esto contradice las aplicaciones de *Pichia pastoris* en muchas plantas de producción menos especializadas. Además la estabilidad de las proteínas en presencia de metanol puede obstaculizar la inducción de la expresión de las proteínas basada en metanol. Esto es menos crítico para la producción de proteínas industriales fuertes, pero se convierte en una cuestión importante para, por ejemplo, proteínas terapéuticas secretadas.

La construcción de dichos promotores requiere el conocimiento de partes específicas (por ejemplo, elementos reguladores, sitios de unión a factores de transcripción) del promotor de *AOX1* de tipo silvestre de *Pichia pastoris* que -cuando muta de alguna manera- presentan un efecto en el comportamiento de la expresión. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención identificar estas partes y proporcionar, por tanto, los medios para crear promotores de *AOX1* con características mejoradas.

Por lo tanto, la presente invención refiere a un promotor mutante de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* del promotor de *AOX1* de *Pichia pastoris* de tipo silvestre (SEC ID N° 1) como se define en las reivindicaciones. Adicionalmente, dicho promotor mutante puede comprender al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

a) un sitio de unión a factores de transcripción (TFBS),

b) los nucleótidos 170 a 191 (-784 a -763), los nucleótidos 192 a 213 (-762 a -741), los nucleótidos 192 a 210 (-762 a -744), los nucleótidos 207 a 209 (-747 a -745), los nucleótidos 214 a 235 (-740 a -719), los nucleótidos 304 a 350 (-650 a -604), los nucleótidos 364 a 393 (-590 a -561), los nucleótidos 434 a 508 (-520 a -446), los nucleótidos 509 a 551 (-445 a -403), los nucleótidos 552 a 560 (-402 a -394), los nucleótidos 585 a 617 (-369 a -337), los nucleótidos 621 a 660 (-333 a -294), los nucleótidos 625 a 683 (-329 a -271), los nucleótidos 736 a 741 (-218 a -213), los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216), los nucleótidos 726 a 755 (-228 a -199), los nucleótidos 784 a 800 (-170 a -154) o los nucleótidos 823 a 861 (-131 a -93) de la Sec ID N°: 1, y combinaciones de los mismos. Los números entre paréntesis (negativos) a lo largo de la descripción, reflejan las posiciones correspondientes del promotor en relación con el codón de inicio de la traducción (por ejemplo, ATG). Por ejemplo, la "A" de "ATG" en una secuencia de ácido nucleico que comprende N₁GACTATGN₂, corresponde a la posición de + 1, mientras que la "T" antes de la "A" de "ATG" corresponde a la posición de -1.

De acuerdo con la presente invención, el promotor mutante de *AOX1* comprende al menos una mutación, dentro de un sitio de unión a factores de transcripción y/o de uno de los intervalos de las secuencias de ácido nucleico indicadas anteriormente. Resultó que, especialmente, estas regiones del promotor de *AOX1* son adecuadas para modificar a dicho promotor con el fin de modificar sus características. Por supuesto, también puede introducirse una combinación de las mutaciones indicadas anteriormente para mejorar las características de un promotor de *AOX1* (por ejemplo, dos mutaciones en TFBS seleccionadas de a), una mutación de TFBS, seleccionada de a) y una mutación seleccionada de b), una mutación seleccionada de a) y dos mutaciones seleccionadas de b)). Por ejemplo, una mutación de un TFBS puede combinarse con una mutación dentro de los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) y/o en los nucleótidos 207 a 209 (-747 a -745) de la Sec ID N°: 1. La expresión de una proteína bajo el control de un promotor de *AOX1* en *Pichia pastoris* se induce generalmente por la adición de metanol y se inhibe por la presencia de glucosa en el medio. Con el fin de potenciar o de reducir el efecto de dichos aditivos en el medio sobre la expresión de proteínas, el promotor muta preferentemente en las regiones promotoras indicadas anteriormente. La eficacia de los promotores mutados de *AOX1* para producir una proteína de interés varía dependiendo de la cantidad (es decir, copias) del vector integrado en el cromosoma del hospedador. Especialmente, cepas multicopia resultaron mostrar efectos potenciados del promotor. Dado que la resistencia a antibióticos de las cepas de *Pichia* depende del número de casetes de resistencia a antibióticos (los vectores introducidos en un hospedador comprenden, preferiblemente, un casete de resistencia a antibióticos, lo que permite al hospedador crecer sobre/en un medio que comprende un antibiótico como marcador selectivo) integrados en el cromosoma de dicho hospedador, pueden producirse cepas multicopia aplicando concentraciones en aumento del antibiótico (dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 mg/ml, preferiblemente de 50 µg/ml a 1000 µg/ml; dependiendo del antibiótico usado; por ejemplo, genética: de 0,1 a 10 mg/ml, preferiblemente de 0,2 a 5 mg/ml, particularmente de 0,25 a 4 mg/ml, zeocina: de 10 a 5000 µg/ml, preferiblemente de 50 a 3000 µg/ml, particularmente de 100 a 2000 µg/ml) sobre las placas de agar selectivas para aumentar la presión de selección (por ejemplo, [14]; Scorer, C. A. *et al* (1994) *Bio/Technology* 12:181-184). Sin embargo, se observó que el crecimiento de células que contienen una multiplicidad de casetes de resistencia a antibióticos no sólo depende de la concentración del antibiótico, sino que también depende del tiempo. Por lo tanto, para proporcionar una colonia detectable, las cepas multicopia pueden crecer, en un medio que contiene la misma concentración de antibiótico, en un período de tiempo más corto que las cepas unicopia. Este comportamiento permite al experto en la materia detectar y aislar cepas multicopia antes de que las cepas unicopia comiencen a crecer. Por ejemplo, una cepa que contiene una sola copia de un casete de resistencia a antibióticos crece en una placa de agar para proporcionar un tamaño de colonia detectable en 72 horas, mientras que la misma cepa, que contiene más de una copia de dicho casete, crece en 24 a 48 h para proporcionar el mismo tamaño.

Especialmente, las cepas multicopia que contienen un promotor de *AOX1* con mutaciones dentro de los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y dentro de los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) mostraron tasas de expresión sorprendentemente potenciadas.

Para aumentar la eficacia de expresión de las proteínas de un hospedador en presencia de metanol, preferiblemente se mutan los nucleótidos 170 a 235 (-784 a -719) del promotor de *AOX1* (SEC ID N°: 1). Una mutación en esta región, aumenta la expresión de las proteínas del 120 al 130%, en comparación con el promotor de *AOX1* de tipo silvestre, siempre que el plásmido, que lleva el promotor mutante de *AOX1*, se integre sólo una vez en el cromosoma/genoma del hospedador (mutante unicopia). Sin embargo, las mutaciones dentro de las otras regiones restantes mencionadas anteriormente, reducen o no influyen en la eficacia del metanol para inducir la expresión de las proteínas. A diferencia de esto, las mutaciones en las regiones promotoras del promotor de *AOX1* de tipo silvestre, (como se ha indicado anteriormente) conducen - dependiendo de la mutación - a aumentar y a disminuir la expresión de las proteínas en condiciones de desrepresión (véase, por ejemplo, la Tabla 13, ejemplo 1).

Sin embargo, cepas recombinantes que contienen más de una copia de promotores mutados de *AOX1* dan como resultado cepas que tienen una actividad potenciada en condiciones de desrepresión e inducidas por metanol (cepas multicopia, véase, por ejemplo, la Fig. 7, ejemplo 2). Detalladamente, cepas multicopia que contienen mutaciones dentro de los nucleótidos 694 y 723 de la SEC ID N°: 1 (d6), dentro de los nucleótidos 694 y 723 (-260 y -231) de la SEC ID N°: 1 (d6), dentro de los nucleótidos 694 y 723 (-260 y -231) y dentro de los nucleótidos 304 y 350 (-650 y -604) de la SEC ID N°: 1 (d2d6), dentro del TFBS, especialmente dentro de Rap1, Gcr1, QA-1F, Hsf_1, Adr1, Hsf_2, Mat1MC, abaA y Hap2345, muestran una expresión aumentada en condiciones de desrepresión y/o bajo inducción con metanol para la expresión de proteínas bajo el control del promotor de *AOX1* de tipo silvestre. En condiciones de desrepresión, algunas de estas cepas multicopia muestran expresiones de proteínas aumentadas aproximadamente 10 veces en comparación con expresiones bajo el control del promotor de tipo silvestre. En presencia de metanol como inductor, la eficacia de la expresión se potencia más de 5 veces cuando se emplea un promotor de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, estas mutaciones, especialmente cuando están presentes en el hospedador en una forma multicopia, se emplean preferiblemente para la expresión de proteínas. La combinación de dos o más de las mutaciones mencionadas anteriormente, puede potenciar adicionalmente la fuerza del promotor (véase, por ejemplo, la Fig. 7, ejemplo 2).

Los sitios de unión a factores de transcripción pueden identificarse experimentalmente (por ejemplo, por análisis de cambio de movilidad o impresión) o por comparación de secuencias con sitios de unión a factores de transcripción conocidos (por ejemplo, por análisis informático, [15]).

El conocimiento de regiones promotoras, que influyen en la fuerza y en las características de dicho promotor, puede usarse para diseñar promotores con distintas propiedades (expresión alta de proteínas en condiciones de desrepresión

y/o expresión alta de proteínas en presencia de metanol). Además, si estos promotores mutantes se integran una o más veces en el genoma del hospedador, estas propiedades pueden potenciarse o modificarse (véanse, por ejemplo, los ejemplos de 1 a 3).

Sin embargo, en algunos casos la actividad del promotor debe disminuir en lugar de aumentar. Especialmente, en muchos casos, es necesario que la co-expresión de proteínas reguladoras como quinasas, fosforilasas y proteínas auxiliares, tales como, por ejemplo, proteínas acompañantes, proteínas disulfuro isomerasas, cis-trans isomerasas, foldasas, y proteasas, sea baja en comparación con el producto principal, que puede producirse por la célula bajo el promotor de tipo silvestre o bajo un promotor mejorado de acuerdo con la presente invención. Especialmente, la expresión combinada de dos productos diferentes (por ejemplo, una proteína auxiliar y el producto principal) bajo el control de un promotor de AOX1 con actividad aumentada y un promotor de AOX1 con actividad disminuida (en comparación con la actividad de tipo silvestre), respectivamente, resultó ser ventajosa, porque la tasa de expresión del producto principal y secundario difiere mucho más en lugar de usar promotores de AOX1 de tipo silvestre. La expresión reducida puede obtenerse preferiblemente delecionando sitios de unión al activador como HSF o HAP o insertando sitios de unión al represor en el promotor de AOX1 de tipo silvestre. Por lo tanto, el uso del promotor de AOX1 con actividad reducida evita la sobrecarga de la maquinaria de expresión de proteínas de la célula, que tendría como consecuencia, la reducción del rendimiento del producto principal. Por ejemplo, Bessette P H *et al.* (PNAS USA (1999) 96:13703-13708) pudieron demostrar que la expresión de un polipéptido activo podía aumentarse significativamente mediante la co-expresión de una tiorredoxina.

De acuerdo con una realización preferida el promotor comprende además una mutación dentro de los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y/o de los nucleótidos 729 a 763 (-225 a -191) de la Sec ID N°: 1.

Una mutación que afecta a estos nucleótidos varía en combinación con una mutación como se ha indicado anteriormente, dando como resultado la actividad del promotor aún más mejorada. Por ejemplo, una mutación doble que afecte a los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y a los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) de la Sec ID N° 1 conduce a un promotor que muestra mayores niveles de expresión bajo desrepresión así como en condiciones inducidas en comparación con los niveles de expresión bajo las mismas condiciones del promotor de tipo silvestre. Cuando el ácido nucleico, que comprende el promotor, se introduce en la célula en más de una copia (dando como resultado un clon multi-copia), puede mejorarse el efecto de esta mutación doble.

La mutación es, preferiblemente, una delección, una sustitución, una inserción, una inversión y una multiplicación.

Para modificar las características del promotor de AOX1 de tipo silvestre de *Pichia pastoris* son posibles varios tipos de mutaciones. Los tramos del promotor que comprenden las regiones mencionadas anteriormente (sitios de unión a factores de transcripción (TFBS), los nucleótidos 170 a 235 (-784 a -719), 170 a 191 (-784 a -763), 192 a 213 (-762 a -741), 192 a 210 (-762 a -744), 207 a 209 (-747 a -745), 214 a 235 (-740 a -719), 304 a 350 (-650 a -604), 364 a 393 (-590 a -561), 434 a 508 (-520 a -446), 509 a 551 (-445 a -403), 552 a 560 (-402 a -394), 585 a 617 (-369 a -337), 621 a 660 (-333 a -294), 625 a 683 (-329 a -271), 694 a 723 (-260 a -231), 729 a 763 (-225 a -191), 736 a 741 (-218 a -213), 737 a 738 (-217 a -216), 726 a 755 (-228 a -199), 784 a 800 (-170 a -154) o 823 a 861 (-131 a -93) de la Sec ID N°: 1) pueden deleccionarse o sustituirse parcial o completamente, por otros nucleótidos o secuencias de ácido nucleico, alterarse por inserción de nucleótidos individuales o secuencias de ácido nucleico, invertirse parcial o completamente o multiplicarse. Todas estas mutaciones conducen a un cambio en la actividad del promotor, porque las características estructurales y/o los sitios de unión/reconocimiento, por ejemplo, factores de transcripción, se ven afectados por dichas mutaciones. Sin embargo, estos cambios pueden conducir a una actividad aumentada o disminuida del promotor en comparación con el promotor de tipo silvestre.

Es bien conocido en la técnica anterior que la multiplicación/duplicación de tramos específicos de ácidos nucleicos puede aumentar la actividad del promotor. La regulación de la expresión génica de muchos promotores eucariotas, especialmente promotores de levaduras, implica interacciones múltiples entre los factores de transcripción unidos dentro de un promotor. Para el funcionamiento de incluso los elementos más pequeños que actúan en cis, pueden necesitarse sitios múltiples. En células de levaduras, para la transcripción son necesarias secuencias activadoras aguas arriba (UAS). Estas operan en cualquier orientación y a una distancia variable con respecto a la caja TATA y al sitio de inicio de la transcripción, pero a diferencia de los amplificadores en eucariotas superiores, deben estar aguas arriba desde estos elementos basales. Las UAS son dianas de varios activadores transcripcionales.

La mayoría de los fenómenos de represión en células de levadura producen la inactivación o la ausencia de factores de transcripción. Sin embargo, también pueden identificarse algunos sitios reguladores negativos (secuencias de represión aguas arriba (URS)).

Basándose en el análisis de delección del promotor de AOX2 de *P. pastoris* se encontraron tres regiones reguladoras, dos regiones de acción negativa (URS1 y URS2) y un dominio de acción positiva (UAS) [3]. Para el promotor de MOX de *H. polymorpha* también se describieron dos secuencias de activación aguas arriba (UAS1 y UAS2) y un sitio de unión al represor (URS1) [8]. También pudieron identificarse secuencias correspondientes en promotores de AOX1 (nucleótidos 585 a 614 (-369 a -340) y 725 a 756 (-229 a -198), mostrando similitudes con las UAS de AOX2 [3], así como nucleótidos 622 a 656 (-332 a -298) [8]). La multiplicación (2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces de UAS) de estos tramos de ácido nucleico pueden producir un promotor con una fuerza mejorada conduciendo a la expresión de proteínas aún más potente. Por lo tanto, la construcción de promotores que comprenden UAS múltiples, que impliquen preferiblemente

ES 2 356 127 T3

las regiones de las secuencias mencionadas anteriormente similares a las UAS de *AOX2* y de *MOX*, u otros tramos de secuencias múltiples (por ejemplo, los intervalos de secuencias de ácido nucleico descritos anteriormente) también se encuentran en el ámbito de la presente invención y se considera que es una realización preferida. Normalmente una secuencia de activación se encuentra dentro de algunos cientos de pares de bases de un promotor. Por ejemplo, las secuencias de más activación se encuentran aproximadamente dentro de 200 a 400 pares de bases del promotor que se mejora. Además, normalmente aguas arriba, el promotor contiene más amplificadores y sitios de unión a factores de transcripción.

Al menos una mutación del promotor de *AOX1* puede introducirse por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia (por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (tercera edición), J. Sambrook y D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención el sitio de unión a factores de transcripción (TFBS) se selecciona del grupo que consiste en Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC, Gcr1 y QA-1F.

La mutación de al menos uno de estos TFBS produce promotores mutantes con diversas características (véase el ejemplo 2).

Preferiblemente, el sitio de unión a factores de transcripción (TFBS) Hap1 comprende los nucleótidos 54 (-900) a 58 (-896) de la Sec ID N°: 1, Hsf los nucleótidos 142 (-812) a 149 (-805) y 517 (-437) a 524 (-430) de la Sec ID N°: 1, Hap234 los nucleótidos 196 (-758) a 200 (-754), 206 (-748) a 210 (-744) y 668 (-286) a 672 (-282) de la Sec ID N°: 1, abaA los nucleótidos 219 (-735) a 224 (-730) de la Sec ID N°: 1, Stre los nucleótidos 281 (-673) a 285 (-669) de la Sec ID N°: 1, Rap1 los nucleótidos 335 (-619) a 339 (-615) de la Sec ID N°: 1, Adr1 los nucleótidos 371 (-583) a 377 (-577) de la Sec ID N°: 1, Mat1MC los nucleótidos 683 (-217) a 687 (-267) de la Sec ID N°: 1, Gcr1 los nucleótidos 702 (-252) a 706 (-248) de la Sec ID N°: 1 y QA-1F los nucleótidos 747 (-207) a 761 (-193) de la Sec ID N°: 1.

Estos TFBS pueden identificarse experimentalmente o por comparación con los TFBS de otros promotores conocidos (por ejemplo, los promotores de eucariotas) con la ayuda de programas informáticos (véase, por ejemplo, el ejemplo 1).

En la tabla 2 se proporciona un resumen de la influencia de promotores mutantes de *AOX1* en la expresión de proteínas, péptidos o ácidos nucleicos funcionales (en comparación con la actividad de tipo silvestre),

TABLA 2

Influencia de mutantes del promotor de AOX1 de tipo silvestre en la expresión de proteínas, péptidos o ácidos nucleicos funcionales

Mutación	Clon unicopia		Clon multicopia	
	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹
ΔHap1		+		
ΔHsf_1	-	+	+	+
Δ1	+	+		
ΔHap2345_1		+		+
ΔHap2345_2	-	+		+
ΔabaA	-		+	+
ΔStre	+	+		
Δ2		-		
ΔRap1	-		+	+

ES 2 356 127 T3

Mutación	Clon unicopia		Clon multicopia	
	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹
Δ3	-	-		
Δadr1	-	-	+	+
Δ4	-	-		
ΔHsf_2				
Δ5	-	-		
ΔHap2345_3			+	+
ΔMat1MC				
Δ6	+	+	+	+
Δ6*	+	-	+	+
ΔGcr1	-	+	+	+
Δ7	-	-		
ΔQA-1F	+		+	+
ΔQA-1Fzus	+	-		
ΔHsf_2_dHap 2345_1		+	+	+
ΔHsf_2_dHap 2345_1zus		+		
ΔHsf_2_Mat1MC	-		+	+
Δ8	-	-		
Δ9	-	-		
Δ2Δ6		-	+	+
Δ736-41		-		
Δ737-38				
ΔlnD-d4m				
ΔD-d4				
Δ1-1				
Δ1-2				
Δ1-3				
Δ1-Sacl				

Mutación	Clon unicopia		Clon multicopia	
	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹	Estado de desrepresión ¹	Estado inducido con metanol ¹
¹ tasa de expresión en comparación con el promotor de AOX1 de tipo silvestre: - disminuida, + aumentada				

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula ácido nucleico que comprende un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con la presente invención y a un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional, en el que el promotor y dicho ácido nucleico se encuentran operativamente unidos entre sí.

El promotor mutante de AOX1 puede unirse un gen que codifica una proteína (por ejemplo, una enzima), un péptido (por ejemplo, una hormona) o un ácido nucleico funcional (por ejemplo ARNsi). El fragmento del ácido nucleico resultante puede usarse para expresar, por ejemplo, una proteína cuando se introduce en un organismo, preferiblemente una levadura, especialmente una cepa de *Pichia pastoris*. La construcción de dicha molécula de ácido nucleico es bien conocida por un experto en la materia y puede realizarse con métodos biológicos moleculares convencionales (por ejemplo, Clonación Molecular: A Laboratory Manual (tercera edición), J. Sambrook y D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press; manual "Pichia Expression Kit", Invitrogen Corp.).

"Unido operativamente" se refiere a una primera secuencia (o secuencias) que se posicionan lo suficientemente próximas a una segunda secuencia (o secuencias) de manera que la primera secuencia (o secuencias) puede ejercer influencia sobre la segunda secuencia (o secuencias) o una región bajo el control de esta segunda secuencia. Por ejemplo, un promotor puede unirse operativamente a un gen de manera que el gen se expresará bajo el control del promotor, que típicamente estaría en la posición 5' para el gen. Normalmente, un promotor central estará dentro de algunos cientos de pares de bases del sitio de inicio de la traducción. Aproximadamente 30 pb aguas abajo existe normalmente un elemento promotor aguas abajo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con la presente invención o una molécula de ácido nucleico como se ha indicado anteriormente.

Para introducir el promotor mutante, opcionalmente unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional, en un hospedador, preferiblemente en una cepa de levadura metilotrófica (por ejemplo una cepa de *Pichia pastoris*), dicho promotor tiene que proporcionarse en un vector, que puede usarse para la transformación de dicho hospedador. Por ejemplo, dichos vectores pueden ser plásmidos episomales de levadura (YEpl), plásmidos integradores de levadura (YIp) o cromosomas artificiales de levadura. Dichos vectores comprenden normalmente un origen de replicación (si fuera necesaria la amplificación en hospedadores microbianos) y un marcador de selección para la propagación de los vectores en *E. coli*, promotores y terminadores para la expresión de las proteínas recombinantes en levaduras y marcadores de selección para levaduras. Los vectores no integradores comprenden adicionalmente una secuencia de replicación autónoma (ARS) que garantiza la estabilidad del vector en la célula (por ejemplo, Myers, A.M., *et al.* (1986) Gene 45:299-310). Los vectores integradores que no contienen secuencias AR, comprenden regiones de secuencias que son homólogas a regiones del genoma. De manera alternativa, para la transformación puede usarse ADN lineal, por ejemplo el que se origina a partir de una PCR.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende al menos un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris*, al menos un fragmento de ácido nucleico o al menos vector como se ha descrito en este documento. La introducción de una molécula de ácido nucleico que contiene un promotor mutante de AOX1 (por ejemplo un vector, en el que el promotor está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína) dentro de un hospedador puede realizarse, por ejemplo, por el electroporación. Dicha molécula de ácido nucleico se integra en el cromosoma después de su introducción en dicho hospedador en una sola copia o en múltiples copias o está presente en la célula como un plásmido de replicación autónomo de una sola copia o multicopia. Si se usan varios promotores mutantes, todos pueden estar unidos con solo gen (que codifica una proteína o un ácido nucleico funcional (por ejemplo, ribozima, ARN antisentido etc.), una proteína idéntica o diferentes proteínas (por ejemplo una variante del promotor está unida a un marcador de selección y otro promotor mutante está unido a otra proteína que debe expresarse). Por lo tanto dentro del alcance de la presente invención se producen preferiblemente cepas unicopia que comprenden una copia del promotor de AOX1 unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional, así como cepas multicopia que comprenden más de una, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 copias del promotor de AOX1 unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención dicha célula eucariota, en particular una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica.

Preferiblemente la célula de levadura metilotrófica se selecciona del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*.

Los promotores de *AOX1*, así como variantes mutadas de los mismos, pueden introducirse funcionalmente en una gran cantidad de células de levadura diferentes, que incluyen células metilotróficas (por ejemplo *Pichia pastoris*) y no metilotróficas (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*). El experto en la técnica conoce la posibilidad de transferir los promotores a otros organismos, especialmente promotores de *AOX1* y *MOX*. Aunque la especificidad del sustrato y algunas características reguladoras son diferentes en diferentes levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Hansenula polimorfa* y *Saccharomyces cerevisiae*) se ha demostrado un reconocimiento de promotores extraños (por ejemplo Raschke, W.C., et al., Gene, 1996, 177:163-7; Pereira, G.G. y C.P. Hollenberg, Eur J Biochem, 1996.238:181-91). Por ejemplo el promotor de *MOX* de *H. polymorpha* se reconoce en *S. cerevisiae*, reprimido en presencia de glucosa y desreprimido con limitación de fuente de carbono. De manera similar el promotor de *AOX1* puede emplearse en *H. polymorpha* y se regula de la misma manera que el promotor de *MOX*. El promotor de *ZZA1*, que está estrechamente relacionado con el promotor de *AOX1*, también puede emplearse satisfactoriamente en *S. cerevisiae*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la expresión de una proteína seleccionada o para la transcripción de un ARN funcional, que comprende

- i) un vector como se ha definido anteriormente, y
- ii) una célula que puede expresar dicha proteína o ARN funcional bajo el control de un promotor de acuerdo con la presente invención.

El vector de acuerdo con la presente invención puede usarse en un kit para la expresión o una proteína seleccionada o para la transcripción de un ARN funcional (por ejemplo ribozima, ARN antisentido, ARNi).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica.

Preferiblemente la célula de levadura metilotrófica se selecciona del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la expresión de una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional recombinantes en una célula que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de *AOX1* de acuerdo con la presente invención y un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional, estando dicho promotor unido operativamente a dicho ácido nucleico,
- transformar dicha célula con dicho vector o dicha molécula de ácido nucleico,
- cultivar la célula transformada en un medio de cultivo adecuado,
- opcionalmente, inducir la expresión de dicha proteína, péptido o ácido nucleico funcional y
- aislar dicha proteína, péptido o ácido nucleico funcional expresados.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica.

Preferiblemente la célula de levadura metilotrófica se selecciona del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico, un vector o una célula de acuerdo con la presente invención para la expresión de una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional.

Cuando se usa una molécula de ácido nucleico, un vector o una célula, de acuerdo con la presente invención, para la expresión de una proteína, de un péptido o de un ácido nucleico funcional, es ventajoso seleccionar un promotor de *AOX1* apropiado que satisfaga las necesidades poseídas para la expresión (por ejemplo expresión alta o constitutiva en condiciones de desrepresión (= sin la adición de glucosa al medio o en condiciones inducidas con metanol). Los promotores de *AOX1* mutantes adecuados pueden seleccionarse con la ayuda de la tabla 2.

Otro aspecto de la presente invención se refiere un método para el aislamiento o la superexpresión de clones que comprende las etapas de:

- a) introducir una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris*, de acuerdo con la presente invención, y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína (péptido) o un ácido nucleico funcional y un gen de resistencia a un marcador, en el que dicho promotor y dicho ácido nucleico están unidos operativamente entre sí formando un cassette de expresión uni- o multi-copia o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico en una célula,
- b) transferir la célula de la etapa a) a un medio que comprende un marcador selectivo apropiado, una fuente de carbono no represora y metanol para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de inducción,
- c) incubar la célula de la etapa b) en dicho medio,
- d) aislar una colonia de la célula obtenida de la etapa c) y
- e) detectar clones de superexpresión determinando la tasa de expresión de dicha célula.

La construcción de clones de superexpresión o de expresión alta que contenga un vector o un ácido nucleico que comprenda un promotor mutado inducible por metanol, requiere métodos que permitan al experto en la materia aislar estos clones. Dichos métodos se proporcionan en este documento. La primera etapa de dicho método es la introducción del promotor que comprende el ácido nucleico (por ejemplo un vector) en una célula adecuada, que puede regular dicho promotor. El propio promotor puede mutarse por ingeniería genética o por mutagénesis química (por ejemplo bisulfito, nitrito, ácido fumárico, hidracina) o física (por ejemplo radiación, especialmente radiación UV). En una etapa adicional, la selección de clones de superexpresión se realiza directamente después de la regeneración de la transformación de las células.

La tasa de expresión se determina preferiblemente por métodos como electroforesis en gel (por ejemplo SDS-PAGE), unión a anticuerpos (por ejemplo ELISA), PCR (por ejemplo RT-PCR en tiempo real) cuantitativa (transcriptasa inversa), actividad enzimática (por ejemplo si la proteína expresada es una enzima) o fluorométricamente (proteína con un espectro de emisión característico de tipo proteína verde fluorescente).

Los promotores (transformantes) que muestran expresión aumentada en ausencia de fuentes represoras de C de otra manera (en el caso del promotor de AOX1, glucosa) se seleccionan por crecimiento selectivo de células transformadas en/sobre medios que contienen una fuente de carbono no represora. Los promotores (transformantes) que muestran expresión aumentada en ausencia de fuentes represoras de C de otra manera (en el caso del promotor de AOX1, glucosa) en presencia de un inductor (por ejemplo metanol) se seleccionan por crecimiento selectivo de células transformadas en/sobre medios que contienen una fuente de carbono no represora y el inductor (por ejemplo metanol). El inductor también puede ser una fuente de carbono no represora. Los clones de superexpresión se seleccionan por combinación de una multicopia lo que conduce a mayor resistencia frente a antibióticos (por ejemplo Zeocina) o a mayor productividad de un componente esencial de medios (por ejemplo Leu, His, Arg, Ura) con la selección reguladora descrita anteriormente.

Las composiciones de los medios a usar en el método de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse directamente de los fabricantes o proveedores de kits, células y vectores relacionados con *Pichia pastoris* (por ejemplo, Invitrogen). La concentración de metanol en el medio puede ser preferiblemente del 0,05 al 15%, más preferiblemente del 0,1 al 10%, particularmente del 0,3 al 5%. En la bibliografía científica se describen diferentes concentraciones de metanol para diferentes condiciones de cultivo. Por ejemplo, matraces de agitación pueden contener metanol al 1% o menos (Guarna MM, *et al.* (1997) Biotech. Bioeng. 56: 279-286), los procesos de fermentación pueden contener metanol al 0,5% (Damasceno LM, *et al.* (2004) Protein Expr Purif 37: 18-26; Hellwig S., *et al.* (2001) Biotechnol Bioeng 74: 344-352; Hellwig S., *et al.* (1999) Biotechnol Appl Biochem 30: 267-275).

La expresión mejorada de clones multicopia puede depender no solo de la presencia de más de una copia del promotor mutado en una célula sino también debido a la ausencia de diversos factores de transcripción, porque estos factores pueden unirse a una gran cantidad de sitios de unión a factores de transcripción en dicha célula. Esto podría demostrarse comparando la tasa de expresión en condiciones que inducen metanol con la tasa de expresión en condiciones de desrepresión en la que podría observarse que la tasa de expresión mejorada no solo es un efecto del número de copias del promotor de AOX1 mutado en la célula (efecto no lineal). Por ejemplo, la cepa d6*F10 muestra dicha característica.

El medio usado para aislar clones de superexpresión puede comprender componentes de medios adicionales como leucina, uracilo, arginina, histidina y/o adenina y el sorbitol puede intercambiarse por glucosa para identificar variantes de promotores que muestren una represión reducida en presencia de glucosa en comparación con variantes de promotores de tipo silvestre.

Cuando se usan cepas auxotróficas, la célula puede transferirse a un medio que comprenda sorbitol (u otras fuentes de carbono no represoras) y que contenga componentes de medios individuales (por ejemplo leucina, uracilo, arginina, histidina y adenina) para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de desrepresión empleando marcadores auxotróficos (etapa b)).

El marcador de resistencia P(TEF)-Zeo, habitualmente usado en vectores que comprenden el promotor de AOX1, conduce a la expresión constitutiva de la proteína de resistencia a zeocina y por lo tanto permite el aislamiento de clones multicopia por resistencia frente a mayores concentraciones del antibiótico. El nuevo método descrito permite combinar este efecto con características reguladoras para detectar promotores y clones multicopia que conduzcan a una mayor expresión en determinadas circunstancias reguladoras controlables (por ejemplo expresión desreprimida, expresión inducida etc.). Esto hace posible detectar nuevos promotores con propiedades reguladoras modificadas y también clones en los que los clones multicopia conducen a la expresión mejorada en dichas condiciones reguladoras especiales.

“Clones de superexpresión” son clones de expresión que expresan más de una proteína o de un ácido nucleico funcional bajo el control del promotor mutado que bajo el control del promotor de tipo silvestre o más de una proteína o ácido nucleico funcional que aplicando vectores que normalmente usan combinaciones de marcador de selección-promotor tales como P(TEF)-Zeo. La tasa de expresión de los “clones de superexpresión”, de acuerdo con la presente invención, puede estar aumentada, al menos el 20%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 100%, particularmente al menos el 500%, en comparación con la tasa de expresión de la misma proteína o péptido o ácido nucleico funcional bajo el control del promotor de tipo silvestre (valor medio más de dos a tres veces la desviación típica). “Los clones de superexpresión” pueden comprender preferiblemente más de una copia del promotor mutado o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Como alternativa, los “clones de superexpresión” también pueden denominarse “clones de alta expresión”.

De acuerdo con la presente invención, los “promotores inducibles por metanol” son promotores cuya actividad está regulada por la presencia de metanol en el medio de cultivo. Dicho promotores son preferiblemente promotores de AOX1 (de *Pichia pastoris*) o de MOX (de *Hansenula polymorpha*) o cualquier otro promotor reprimido por glucosa e inducible por metanol, derivado de levaduras metilotróficas, tales como, por ejemplo, FMD, FLD, DAS (véase, por ejemplo, la tabla 6, ejemplo 1).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención el marcador selectivo es un antibiótico, preferiblemente zeocina.

El marcador selectivo a usar en el medio depende de que puedan usarse las características moleculares de las células para distinguir una célula que contiene el ácido nucleico o el vector que comprende un promotor mutado o inducible por metanol de tipo silvestre, de una célula que no contiene dicho ácido nucleico o vector. Por lo tanto, los marcadores selectivos pueden ser antibióticos (los genes de resistencia a antibióticos pueden encontrarse en el vector o en el ácido nucleico introducido en dichas células). Para compensar la auxotrofia de determinadas cepas el marcador selectivo en el medio puede ser una sustancia de tipo leucina, uracilo, arginina, histidina y adenina, dependiendo del tipo de auxotrofia.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico, el vector y la célula son un ácido nucleico, un vector y una célula de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la molécula de ácido nucleico o vector se introduce en la célula por transformación por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, preferiblemente por electroporación, transformación química, fusión de protoplastos o por bombardeo de partículas (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Edited by: Fred M. Ausubel *et al.*; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (tercera edición. Sambrook y D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos sin limitarse estrictamente a los mismos.

La figura 1 muestra una SDS-PAGE de cepas de *P. pastoris* que expresan GFP-Zeo a microescala antes de la inducción con metanol (A) y 24 (B) y 72 (C) horas después de la inducción. Las muestras se prepararon como se describe en el ejemplo 1 h). El carril 1 es X-33 (control negativo), los carriles 2-4 son cepas A9, D2 y E2 Mut^s de X-33 con GFP-Zeo, el carril 5 es d6*F10 de X-33. Una banda fuerte en 42 kDa está presente en todos los clones GFP-Zeo.

La figura 2 muestra una visión de conjunto de delecciones de secuencia dentro de la región del promotor AOX1 y algunos de los sitios de unión a la transcripción. Las regiones delta 1-9 se deleccionaron por PCR de extensión por solapamiento.

La figura 3 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia de variantes del promotor AOX1 a microescala después de la desrepresión (privación de carbono). Las células crecieron en glucosa al 1% a microescala. Los datos representan la media $\pm$ la DT de cuatro mediciones independientes. URF: unidades relativas de fluorescencia; WT: cepa D2 GFP-Zeo de *P. pastoris* con GFP-Zeo bajo el control del promotor AOX1 de tipo silvestre; D1-D9; cepas de *P. pastoris* con construcciones de delección AOX1 Δ 1- Δ 9 delante del gen GFP-Zeo; EX: longitud de onda de excitación; EM: longitud de onda de emisión.

ES 2 356 127 T3

La figura 4 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia de variantes del promotor *AOX1* a microescala después de la inducción con metanol. Las células crecieron en glucosa el 1% a microescala. Los datos representan la media $\pm$ la DT de 4 mediciones independientes. URF: unidades relativas de fluorescencia; WT: cepa D2 GFP-Zeo de *P. pastoris* con GFP-Zeo bajo el control del promotor *AOX1* de tipo silvestre; D1-D9; cepas de *P. pastoris* con construcciones de delección *AOX1Δ* 1-Δ9 delante del gen GFP-Zeo; EX: longitud de onda de excitación; EM: longitud de onda de emisión.

La figura 5 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia de variantes del promotor *AOX1* seleccionadas a microescala. Se muestran niveles de expresión en condiciones de desrepresión así como de inducción de cepas unicopia y cepas multicopia con variantes del promotor $\Delta 6$ y de tipo silvestre. Los datos representan la media $\pm$ la DT de 4 mediciones independientes. WT: cepa GFP-Zeo unicopia con el promotor *AOX1* de tipo silvestre (D2 GFP-Zeo); D6: clon *AOX1Δ6** unicopia; WT_E2: clon GFP-Zeo multicopia con el promotor *AOX1* de tipo silvestre; D6* F10: clon *AOX1Δ6** multicopia (d6F10 X-33).

La figura 6 muestra el resultado de un ensayo por goteo de cepas de *P. pastoris* en placas de agar MD y MDM con concentraciones distintas de ZeocinTM. Las células se cultivaron en medio BMD (1%) a una DO₅₉₅ de 1,5, diluido en etapas de 10 a una proporción de dilución final de 10⁵ y transferido a placas de agar usando un reproductor de 48 pin. Los números en la parte superior del dibujo indican el factor de dilución que es el mismo para todas las placas. El medio MD se preparó como se ha descrito anteriormente. Las placas de MDM-Zeo en metanol se añadieron a una concentración final de aproximadamente el 0,5%. El ZeocinTM se añadió a concentraciones finales de 100, 200 y 500 μ g/ml, respectivamente. X-33: X-33 de *P. pastoris*, A9: A9 Mut^s GFP-Zeo de *P. pastoris*, D2: D2 GFP-Zeo de *P. pastoris*, E2: E2 GFP-Zeo de *P. pastoris*

La figura 7 muestra el nivel de expresión de diversas cepas multicopia en comparación con cepas de referencia; a) actividad en condiciones de desrepresión; b) actividad después de inducción con metanol.

La figura 8 muestra el nivel de expresión de cepas multicopia $\Delta 6^*$ en condiciones de desrepresión y de inducción en comparación con cepas de referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Materiales y métodos

a) Preparación de ADN/Kits de purificación

De acuerdo con los manuales proporcionados (véase la Tabla 3), se usaron diversas preparaciones de ADN y kits de purificación disponibles en el mercado.

TABLA 3

Preparación de ADN y Kits de purificación

Kit	Fabricante
Kit Easy-DNA TM	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, Estados Unidos
Kit QIAprep® Spin Miniprep	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania
Sistema de purificación de ADN Wizard® Plus SV Minipreps	Promega GmbH, Mannheim, Alemania
Kit GenElute TM High Performance (HP) Plasmid Midiprep Alemania	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Viena, Austria
Kit de extracción QIAquick® Gel	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania
Columnas de centrifugación de extracción en gel de ADN Quantum Prep TM Freeze N Squeeze	Bio-Rad Laboratories GmbH, Viena, Austria
Kit de purificación QIAquick® PCR	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania

b) *Clonación TOPO®*

La clonación TOPO® se realizó de acuerdo con los manuales proporcionados (para la clonación en pCR®4Blunt-TOPO® y para la clonación en pCR®-Blunt II-TOPO®). Para la clonación se usaron siempre 4 µl de producto PCR.

De acuerdo con los protocolos mencionados anteriormente, 2 y 4 µl de cada reacción de clonación se transformaron en células TOP10F' de *E. coli* químicamente competentes One Shot® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, Estados Unidos).

c) *Transformación de E. coli*

La transformación de reacciones de ligamiento y plásmidos en *E. coli* se realizó de acuerdo con el protocolo SEM (método simple y eficaz) [16]. Para la transformación se usaron células TOP10F' de *E. coli* químicamente competentes.

d) *Transformación de Pichia pastoris*

Preparación de células competentes de *Pichia pastoris*: Se usó una sola colonia de la cepa hospedadora de *Pichia pastoris* deseada para inocular 50 ml de YPD (glucosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer, de cuello ancho con deflectores, de 300 ml. Después de una noche de incubación a 30°C, humedad al 60% y a 130 rpm (Pilot Shackle® RC-2 TE) se usó un determinado volumen de este precultivo para inocular 200 ml de YPD (glucosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer, de cuello ancho con deflectores, de 2 l a una densidad óptica aproximadamente de 0,1 a 595 nm (DO595). El cultivo se cultivó con las mismas condiciones que el precultivo a una densidad óptica de 1,0 a 1,5. Las células se sedimentaron a 4°C y a 4000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 200 ml de agua estéril enfriada con hielo. Este procedimiento se repitió 3 veces con la re-suspensión de las células en 100 ml de agua, 10 ml de sorbitol 1 M y 0,5 ml de sorbitol 1 M respectivamente.

Se linealizaron 10 µg del plásmido deseado con *Bgl*II y *Not*II (50 u cada una) durante una noche en un volumen final de 300 µl. Después de la digestión por restricción el ADN se precipitó en EtOH y acetato de sodio 0,3 M de acuerdo con un protocolo convencional [16]. El ADN se disolvió en 11 µl de ddH₂O estéril y desalinizada usando un filtro de membrana MF-Milipore™ (véase la Tabla 12) durante aproximadamente 1-2 h. Si para la transformación se usó un producto PCR se procesaron aproximadamente 4-5 µg de ADN como se ha descrito anteriormente comenzando con la precipitación en EtOH.

Para cada transformación, se mezclaron 80 µl de las células preparadas con 10 µg de ADN como se ha descrito anteriormente y se incubó durante 5 minutos en hielo. La mezcla se transfirió a cubetas de electro-transformación enfriadas con hielo (Bio-Rad) y se impulsaron a 200 Ω, 25 µF y 2,5 kV. Inmediatamente, se añadió 1 ml de sorbitol 1 M enfriado con hielo. La suspensión se transfirió a un tubo PP estéril de 12 ml (Greiner, Frickenhausen, Alemania, n° 184261) estéril y se incubó durante 2 horas a 30°C sin agitación. Después de esta fase de regeneración las alícuotas se sembraron en placas sobre placas de selección. Para la selección de transformantes con alta expresión en condiciones de inducción, las células se sembraron en placas sobre placas de MSM-Zeo que contenían medio mínimo con sorbitol (o cualquier otra fuente de carbono no represora) metanol y zeocina. Para la selección de clones que mostraban expresión alta en condiciones de desrepresión, las células pudieron sembrarse en placas sobre placas con zeo en sorbitol mínimo sin metanol. La inclusión de glucosa a placas de selección que contenían metanol permitió la detección de clones de expresión no reprimidos por glucosa y sus promotores.

e) *PCR realizada en una colonia*

Se resuspendió una sola colonia de la cepa de *Pichia* deseada en 100 µl de ddH₂O en un micro-tubo de 100 µl y se calentó de 5 a 10 minutos a 95°C. Después de la centrifugación a 13.200 rpm durante 1 minuto se usaron 10 µl de sobrenadante como molde para la relación PCR. Como molde para una segunda ronda, se usaron 5 µl de esta primera ronda de PCR. 5 µl de la segunda ronda de PCR se usaron para un gel de control. Las relaciones PCR contenían 10 pmol de cada cebador (AOX1_col y GFPprev), 200 µM de cada dNTP y 2,5 unidades de ADN polimerasa Hot Star Taq® (QIAGEN) o Taq ADN polimerasa (Promega) en condiciones tamponantes, de acuerdo con los manuales proporcionados, en un volumen final de 50 µl. Para la secuenciación el segundo producto PCR se purificó usando el Kit de purificación para PCR QIAquick®.

TABLA 4

Programa de temperaturas de la PCR realizada en una colonia

Temperatura	Taq	Hot Star Taq®	Ciclos
95°C	5 min	15 min	1
95°C	30 seg	30 seg	
57°C	30 seg	30 seg	
72°C	1 min y 30 seg	1 min y 30 seg	30
72°C	10 min	10 min	1

ES 2 356 127 T3

f) Aislamiento de ADN genómico de *Pichia pastoris*

La cepa *P. Pastoris* deseada se cultivó durante una noche en 5 ml de YPD en un tubo PP estéril de 12 ml en un barril de rotación a 30°C a una DO 595 final de 5-10. De acuerdo con el protocolo proporcionado, se usaron 1,5 ml del cultivo para el aislamiento del ADN usando el kit Easy-DNA™.

g) Ensayo de proteínas

La medición de la concentración de proteínas en solución se ha usado durante mucho tiempo en bioquímica. Una de sus principales aplicaciones es para normalizar una amplia diversidad de métodos bioquímicos con respecto a la cantidad de proteína total como se realiza en el presente caso para las tasas de consumo de oxígeno. Las formas más normalmente usadas para determinar las concentraciones de proteína son los métodos de Bradford, Lowry y BCA™. Estos métodos tienen limitaciones definidas con respecto a sensibilidad, intervalo dinámico y compatibilidad en relación con los reactivos específicos. Entre estos tres ensayos, el de Bradford y Lowry son más fiables y reproducibles que el BCA™. Por otro lado Lowry y Bradford poseen rigurosas limitaciones cuando están presentes detergentes y/o agentes de reducción dando como resultado elevados valores en blanco. Por lo tanto, el ensayo BCA™ es el método de elección después de lisis química. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando el ensayo BCA™ después de la lisis celular química con Y-Per® y BSA de acuerdo con los manuales de instrucción convencionales (Pierce Biotechnology Inc.) por lo tanto, a continuación, tan solo se describirán brevemente las principales etapas. Se centrifugaron 200 µl de los cultivos a 4000 rpm y a 4°C durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante el sedimento se resuspendió en 100 µl de Y-Per® transfiriendo con pipeta hacia arriba y abajo. La suspensión se incubó en microtubos de 1,5 ml en una termomezcladora a temperatura ambiente y a 600 rpm durante 20 minutos. Después de que los desechos celulares se sedimentasen a 13.200 rpm y a temperatura ambiente durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo micro-tubo y se almacenó a 4°C para el ensayo BCA™ o SDS-PAGE. Se mezclaron 25 µl de la muestra en un pocillo de una microplaca con 200 µl de reactivo de trabajo BCA™ (reactivo A: reactivo B = 50:1), se agitó cuidadosamente durante 30 segundos y se cubrió herméticamente con selladores de placa (Promega). Después de la incubación durante 30 minutos a 37°C y enfriamiento a temperatura ambiente se determinó la absorción a 562 nm usando un lector de placa Spectramax Plus 384. Si fuera necesario, las muestras se diluyen con ddH₂O antes del ensayo BCA.

h) SDS-PAGE

Para la SDS-PAGE se prepararon muestras por lisis celular química usando como reactivo Y-Per®, como se ha descrito en la sección anterior. Se mezclaron 10 µl del lisado con 10 µl de SSB (tampón sigma para muestras) 2x y se incubó a 95°C durante 5-10 minutos y 15 µl de esta mezcla se cargaron sobre el gel de proteína. La electroforesis se realizó con 180 V durante aproximadamente 1 hora y las bandas de las proteínas se detectaron usando tinción azul de Coomassie™.

TABLA 5

Preparación del gel para la SDS-PAGE

	<i>Gel de carga (4%)</i>	<i>Gel de resolución (12%)</i>
ddH ₂ O	3,05 ml	3,35 ml
Acrilamid/bis al 30%	650 µl	4 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml	
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8		2,5 ml
SDS al 10% (p/v)	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl
APS al 10%	25 µl	50 µl

i) Ensayo de glucosa

Las concentraciones de glucosa se determinaron usando el método glucosa-hexoquinasa UV sin desproteinización (DIPRO med Handels GMBH, Weigelsdorf, Austria, Prod. n°. D590522). Se transfirieron 50 µl de cultivos de *Pichia* a una microplaca de PCR y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se añadieron 10 µl de sobrenadante a 190 µl de reactivo hexoquinasa en una microplaca UV-Star y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, se determinó la absorción a 350 nm usando un lector de placa Spectramax Plus 384.

j) Ensayos por goteo

Se cultivaron cepas de *P. pastoris* en BMD (1%) a una DO595 final de 1,5 y se diluyó en etapas de 10 a una proporción de dilución final de 10⁵. La transferencia sobre las placas de agar se realizó con un reproductor de 48 pin. Las placas se incubaron a 30°C hasta que aparecieron las colonias (normalmente dos días en placas de MD).

k) Alineamientos de secuencias

Todos los alineamientos de secuencias se realizaron usando MultAlin en la página principal del INRA (Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Paris, Francia) (prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) [17] o con ClustalW en el Instituto Bioinformático Europeo (EBI, www.ebi.ac.uk/clustalw) [18]. Para la comparación de secuencias con MultAlin siempre se usó la matriz parecida a la secuencia de ADN para comparación.

Los genes de la ruta de utilización de metanol y la mayoría de los genes peroxisomales se regularon de un modo similar con respecto a la represión de glucosa, desrepresión con privación de carbono e inducción mediante metanol. Una regulación transcripcional similar con un conjunto definido de factores de transcripción (represores así como inductores) debe ser responsable de este patrón de regulación. Los sitios de unión a factores de transcripción dentro de estas regiones promotoras deben mostrar algunas regiones conservadas. El alineamiento de secuencias múltiples entre las regiones promotoras de genes co-regulados debe revelar los sitios de unión conservados de los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes concordantes. Se indicó que varios genes de las levaduras metilóticas *P. pastoris*, *H. polymorpha* y *C. boidinii* se co-regulaban y sus secuencias promotoras se asilaron (Tabla 6).

TABLA 6

Genes co-regulados de la ruta de utilización de metanol o agentes peroxisomales de las levaduras metilóticas P. pastoris, H. polymorpha y C. boidinii

Levadura	Gen	Enzima	Nº de acceso al Genbank	Bibliografía
<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	alcohol oxidasa		www.invitrogen.com
	<i>AOX2</i>	alcohol oxidasa	X79871	
	<i>ZZA1</i>	alcohol oxidasa	S62281	
	<i>FLD1</i>	formaldehído deshidrogenasa	AF066054	
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	metanol oxidasa	A11156	
	<i>DAS</i>	dihidroxiacetona sintasa	A11168	
	<i>CAT</i>	catalasa	X56501	
<i>C. boidinii</i>	<i>AOD1</i>	alcohol oxidasa	M81702	
	<i>FLD1</i>	formaldehído deshidrogenasa	AB085186	
	<i>FDH1</i>	formiato deshidrogenasa	AB035095	
	<i>DAS1</i>	dihidroxiacetona sintasa	AB035094	
	<i>PMP20</i>	Proteína de la	AB035096	

ES 2 356 127 T3

Levadura	Gen	Enzima	Nº de acceso al Genbank	Bibliografía
		membrana peroxisomal		
	<i>PMP47</i>	Proteína de la membrana peroxisomal	AB035097	
	<i>CTA1</i>	catalasa	AB064338	

1) Análisis de factores de transcripción

El análisis de factores de transcripción se realizó con MatInspector Release professional 6.1, enero 2003, dentro del paquete informático GenomatixSuite 1.6.1 de Genomatix Software GmbH Servers [15]. Para buscar sitios de unión a factores de transcripción, Se usó la secuencia PAOX1 de pPICZ B usando Matrix Family Library Versión 3.1.1 abril 2003 grupo ALL fungi.lib (www.genomatix.de).

m) Cebadores

TABLA 7

Lista de cebadores usados para los ejemplos descritos (sintetizados por MWG Biotech AG, Eberserg, Alemania)

SEC ID Nº	Nombre	Secuencia	Tf [°C]
2	P(AOX1) dir	AAGGTACCAGATCTAACATCCAAAGACG AAAG	70
3	P(AOX1) inv	CTAGCCATGGTTGAATTCTTTCTGAATAAT TAGTTGTTTTTG	67
4	GFPZeo dir	GAAAGAATTCAACCATGGCTAGCAAAG GAG	70
5	GFPZeo inv	GATGATGGTCTAGAACGTGTCAGTCCTG CTCCTC	70
6	AOX1TT dir	GACACGTTCTAGACCATCATCATCATCA TCATTG	67
7	AOX1TT inv	ATAGCGGCCGACAAACGAAGGTCTC	72

ES 2 356 127 T3

SEC ID Nº	Nombre	Secuencia	Tf [°C]
8	AOX1Δ1 dir	CAACACCCACTTTAGGCTACTA.ACACCA TGACTTTATTAG	71
9	AOX1Δ1 inv	GTTAGTAGCCTAAAGTGGGTGTTG AG G AG AAG AG	70
10	AOX1Δ2 dir	GTTTCATGTTTGTAGATGAGGGCTTTCTG AGTG	67
11	AOX1Δ2 inv	GCCCTCATCTACAAACATGAACCTCGCC AG	71
12	AOX1Δ3 dir	GAGGGCTTTCCCAAATGGCCCAAACTG	70
13	AOX1Δ3 inv	CCATTTGGGAAAGCCCTCATCTGGAGTG	70
14	AOX1Δ4 dir	CGGCCAGTTGTTGGTATTGATTGACGAA TGC	69
15	AOX1Δ4 inv	CAATACCAACAACCTGGCCGTTAGCATTT C	71
16	AOX1Δ5 dir	GCTTCTGAACCTTGTCTCCACATTGTAT GCTTC	68
17	AOX1Δ5 inv	GTGGAGACAAGGTTTCAGAAGCGATAGA GAGAC	68
18	AOX1Δ6 dir	GTCTCCACACTGCTGATAGCCTAACGTT C	66
19	AOX1Δ6 inv	GGCTATCAGCAGTGTGGAGACAATGCAT AATCATC	71
20	AOX1Δ7 dir	GGAATACTGCTCTAACCCTACTTGACA GC	65
21	AOX1Δ7 inv	GTAGGGGTTAGAGCAGTATTCCCACCA GAATC	67
22	AOX1Δ8 dir	CTTGACAGCAAGCTGCCCTGTCTTAAAC C	66
23	AOX1Δ8 inv	GGGCAGCTTGCTGTCAAGTAGGGGTTA G	68
24	AOX1Δ9 dir	CTGTCTTAAACCTTACTGGTTCCAATTGA CAAGC	68
25	AOX1Δ9 inv	GGAACCAGTAAGGTTTAAGACAGGGCA GC	69

ES 2 356 127 T3

SEC ID Nº	Nombre	Secuencia	Tf [°C]
26	423 dir	GATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAAC GCAGGACCTCCACTCC	87*
27	1372 dir	GTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCT TACCCTTAAATTTATTTGC	81*
28	2325 dir	CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGT CTCAGACCAT	86*
29	AOX1_col	TCCAAAGACGAAAGGTTGAATG	72
30	GFP inv	CCGTATGTAGCATCACCTTCACC	74
* Tf calculada usando la ecuación 2 (kit de mutagénesis multi-dirigida QuikChange®)			

Ejemplo 1.1

Clonación de la construcción indicadora

Como un indicador para la expresión génica conducida por variantes del promotor AOX1, se usó GFP-Zeo. Las secuencias circundantes al codón de inicio ATG se construyeron para cumplir con los requisitos mínimos de las secuencias consenso de Kozak para genes altamente expresados en levaduras. Para cambiar las regiones promotoras delante del gen GFP-Zeo se insertó un sitio de restricción *EcoRI* (Tabla 8) por PCR de extensión por solapamiento.

TABLA 8

Comparación del sitio de inicio de la traducción y secuencias circundantes entre la secuencia de AOX1 usada en este ejemplo (derivada de pPICZ) y la secuencia de AOX1 de la cepa de P. pastoris, NRRL Y-11430 (Genbank AN: U96967, [2]). El sitio de restricción EcoRI se indica subrayado y los requisitos mínimos de Kozak en las posiciones -3 y +4 se marcan con letras en negrita

				-3	+1	+4	
P (AOX1) -GFP	AAAACA	ACTA	ATTATTgaAa	<u>gaattc</u>	AACc	ATGGCT	AgCa
AOX1 (U96967)	AAAACA	ACTA	ATTATTcgA-	-----	AACg	ATGGCT	AtCc

La producción, basada en PCR, de los componentes del sistema indicador P(AOX1) se amplificó usando, como molde, 10 ng de pPICZ-B con ARS1. La reacción también contenía 10 pmol de cada cebador (P(AOX1)directo y P(AOX1)inverso, respectivamente), 200 µM de cada dNTP y 2,5 U de polimerasa Synergy™ en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 µl.

El AOX1 TT se amplificó de manera similar al promotor AOX1. En esta reacción se usaron, como cebadores, el AOX1TTdirecto y el AOX1TTinverso. Ambas reacciones de PCR se realizaron en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 1 minuto; 55°C, 30 s; 68°C, 2 minutos 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 68°C. Para la amplificación en una segunda ronda, se usaron 2 µl de la primera ronda de PCR, en las mismas condiciones anteriores. La única diferencia fue un aumento de la temperatura de extensión a 72°C.

Se amplificó GFP-Zeo [19] usando, como molde, 25 ng del vector pTracerTM-CMV2. La reacción también contenía 10 pmol de cada cebador (GFP-Zeo directo y GFP-Zeo inverso, respectivamente), 200 μ M de cada dNTP y 2,5 U de polimerasa SynergyTM en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 μ l. La PCR se realizó en un termociclador (véase la tabla 8) durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 30 s; 72°C, 2 min 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Todos los productos de la PCR se purificaron por electroforesis en gel de agarosa antes de la PCR de extensión por solapamiento. La reacción contenía 10 ng de P(AOX1), 5 ng de AOX1 TT y 50 ng de GFP-Zeo, preparados como moldes, como se ha descrito anteriormente, 200 μ M de cada dNTP y 2,5 U de polimerasa SynergyTM en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 μ L. La PCR se realizó en un termociclador (véase la Tabla 8) durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 53°C, 50 s; 68°C, 3 min 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y una etapa de extensión final de 10 min a 68°C. Después de 10 ciclos, se añadieron 10 μ l de una mezcla que contenía 10 pmol de cebadores externos P(AOX1)directo y AOX1TPinverso, de nuevo 200 μ M de cada dNTP y 2,5 U de polimerasa SynergyTM en condiciones de tampón apropiadas. La PCR continuó como estaba programada después de esta adición. El producto de PCR obtenido con el tamaño deseado de aproximadamente 2,4 kb se purificó sobre un gel de azarosa. El producto purificado se clonó en el vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®] y se secuenció. La secuenciación reveló 4 mutaciones y una delección dentro de la construcción indicadora.

El sitio de delección del par de bases se encontró en la posición -15 de la secuencia promotora original. Dado que esta posición estaba dentro del sitio de clonación múltiple de todos los vectores pPICZ (A, B y C; dentro del sitio de restricción *Sfi*I) la delección no debe ejercer influencia sobre la actividad promotora y por lo tanto no era correcta. La primera mutación (T→C) se encontró en la región promotora en la posición -828. Las otras 3 mutaciones se encontraron dentro de la secuencia codificante de GFP-Zeo en las posiciones +122, +507 y +1075, respectivamente.

La conversión G→A en la posición +122 cambia el codón GGA de Gly a un codón GAA produciendo un cambio de aminoácido G41A. La conversión T→C en +507 es una mutación silenciosa que únicamente cambia un codón de R169. La última mutación (T→C) en la posición +1075 cambia el codón de parada TGA al codón de arginina CGA. Las mutaciones -828, +122 y +1075 se repararon con el kit de mutagénesis multi-dirigida QuikChange[®] después de construir el vector pAOX. La mutación silenciosa en la posición +507 y la mutación en el polienlazador no cambiaron ya que no introducen un codón extraño.

pAOX se construyó eliminando el fragmento P_{AOX1}-GFP-Zeo-AOX1TP del vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®] con *Kpn*I y *Not*I e insertándolo en el vector pBlueScript[®] SK entre el sitio *Kpn*I y *Not*I.

Las mutaciones observadas en el promotor AOX1 y en la secuencia GFP-Zeo se corrigieron usando el kit de mutagénesis multi-dirigida QuikChange[®] (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos). La reacción PCR se realizó de acuerdo con el manual proporcionado que contenía 100 ng de pAOX, 100 ng de cebadores mutagénicos (423directo, 1372directo y 2325directo, respectivamente) y 1 μ l de mezcla multienzimática QuikChange[®] en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 25 μ l en un termociclador de 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 65°C, 10 min 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 1 min a 95°C. La digestión con *Dpn*I y la transformación química en células de *E. coli* XL10-GOLD[®] (Invitrogen Corp.) se realizó de acuerdo con el manual proporcionado. La corrección de las tres mutaciones se verificó por secuenciación.

Ejemplo 1.2

Construcción de delecciones del promotor AOX1

Los brazos izquierdos del promotor AOX1 se sintetizaron usando P(AOX1)dir como cebador directo y AOX n inv (n=1...9) como cebadores inversos. Los brazos derechos se sintetizaron con 10 pmol de AOX n dir (n=1...9) como cebadores directos y P(AOX1)inverso como cebador inverso. Todos los brazos se sintetizaron usando 12 ng del vector pAOX como molde y 10 pg de cada cebador. La reacción también contenía 10 pmol de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas en volumen final de 50 μ l. La PCR se realizó en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 68°C, 1 min 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y una etapa de extensión final de 10 min a 68°C. Todos los brazos se purificaron con gel de agarosa antes del uso como molde para la PCR de extensión por solapamiento.

TABLA 9

Pares de cebadores de solapamiento y longitud de brazo para deleciones del promotor

Construcción	Brazo izquierdo		Brazo derecho	
	Cebador interno	Longitud de brazo [pb]	Cebador interno	Longitud de brazo [pb]
PAOX1Δ1	AOXΔ1 inv	184	AOXΔ1 dir	738
PAOX1Δ2	AOXΔ2 inv	315	AOXΔ2 dir	624
PAOX1Δ3	AOXΔ3 inv	374	AOXΔ3 dir	578
PAOX1Δ4	AOXΔ4 inv	519	AOXΔ4 dir	421
PAOX1Δ5	AOXΔ5 inv	636	AOXΔ5 dir	290
PAOX1Δ6	AOXΔ6 inv	708	AOXΔ6 dir	247
PAOX1Δ7	AOXΔ7 inv	742	AOXΔ7 dir	209
PAOX1Δ8	AOXΔ8 inv	794	AOXΔ8 dir	171
PAOX1Δ9	AOXΔ9 inv	833	AOXΔ9 dir	115

La reacción contenía 10 ng de cada brazo preparada, como se ha descrito anteriormente, como moldes, 200 μ M de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 μ l. La PCR se realizó en un termociclador de 30 ciclos (95°C, 45 s; 60°C, 45 s; 68°C, 2 min) con una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 68°C. Después de 10 ciclos, se añadieron 20 μ l de una mezcla que contenía 10 pmol de los cebadores externos P(AOX1)dir y P(AOX1)inv, de nuevo 200 μ M de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas. La PCR continuó según programado después de la adición de la mezcla.

Los productos PCR obtenidos con el tamaño deseado de aproximadamente 898-947 pb se purificaron sobre un gel de agarosa y se clonaron en el vector pCR®4Blunt-TOPO® (Δ2, Δ4, Δ5, Δ7 y Δ8) o en pCR®-Blunt II-TOPO® (Δ1, Δ3, Δ6 y Δ9) y se secuenciaron.

Los vectores pAOXΔ se construyeron eliminando los fragmentos P_{AOX1}Δ de vectores TOPO® con *Bgl*III y *Eco*RI e insertándolos en el vector pAOX entre el sitio *Bgl*III y *Eco*RI en lugar del promotor de AOX1 de tipo silvestre. Los vectores resultantes se verificaron por secuenciación.

Ejemplo 1.3

Transformación de Pichia pastoris y análisis de transformantes

La transformación de *Pichia pastoris* se realizó como se ha descrito anteriormente. La selección para la integración de P_{AOX1} (o P_{AOX1}Δ)-GFP-Zeo-AOX1 TT se realizó dispersando las células de *Pichia* transformadas y regeneradas en alícuotas sobre placas de agar de MSM-Zeo.

Las cepas de *Pichia pastoris* se cultivaron en placas de pocillos profundos que contenían 300 μ l de BMD (al 1%) por pocillo a 28°C, 320 rpm y humedad al 80% durante 6 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se tomaron 50 μ l para la determinación de la fluorescencia por GFP. La inducción se realizó añadiendo 250 μ l de BMM2/pocillo seguido de una incubación adicional de 72 h. El metanol se recargó añadiendo 50 μ l de BMM10 después de 10, 24 y 48 horas. Una vez más se midió la fluorescencia GFP después de 72 horas de inducción con metanol.

Análisis de la expresión de la enzima indicadora. La expresión de GFP-Zeo en *Pichia Pastoris* se analizó por detección de fluorescencia de GFP en el lector de placa Spectramax Gemini XS con excitación a 395 nm y emisión a 507 nm. 50 μ l de cultivos de *P. pastoris* cultivados en placas de pocillos profundos, como se ha descrito anteriormente, se diluyeron 1+3 con ddH₂O en placas de microtitulación FIA. Debido a la cantidad limitada de la muestra solamente se realizaron mediciones simples. Todas las medias $\pm$ desviaciones típicas proporcionadas se calcularon para al menos 3 cultivos diferentes (pocillos).

Si el casete de integración está integrado en el locus AOX, sin sustitución del gen *AOX1*, la cepa recombinante de *Pichia* puede crecer en metanol con una tasa de tipo silvestre, mientras que la sustitución del gen *AOX1* por cruzamiento doble da como resultado una tasa de crecimiento mucho más lenta sobre metanol. Estos dos fenotipos de crecimiento se denominan utilización positiva de metanol (Mut⁺) y utilización lenta de metanol (Mut^s), respectivamente. Para el análisis del fenotipo de utilización de metanol, los cultivos de *Pichia pastoris* a microescala se transfirieron

sobre placas de agar MM y MD usando un reproductor de 96-pin y se incubaron a 30°C durante 2 días. Después de 2 días, si la cepa de *Pichia* posee el fenotipo Mut⁺, aparecen colonias en las dos placas, mientras que las cepas de fenotipo Mut⁻ solamente se producen en placas con MD.

- 5 Todas las cepas de *Pichia pastoris* que derivan de transformaciones de pAOX o de uno de los plásmidos pAOXΔ se analizaron por PCR de colonias y las construcciones de delección también por secuenciación para asegurar la secuencia promotora delante del gen promotor (GFP-Zeo).

10 Ejemplo 1.4

Evolución dirigida del promotor de AOX1

15 Aunque la mutagénesis por PCR en las regiones codificantes de genes está bien desarrollada y establecida no se sabe nada acerca de la mutagénesis sobre las regiones promotoras. Debido a la falta de conocimiento se realizaron diversas condiciones de mutagénesis: para minimizar el sesgo en el espectro mutacional, se usaron dos polimerasas diferentes, una ADN polimerasa Taq y una ADN polimerasa Mutazime[®] (Stratagene Inc.). Debido al total desconocimiento sobre la frecuencia de mutación para la evolución de secuencias promotoras, se ensayaron varias frecuencias de mutación (teóricamente de 1 a ~14/kb).

20 Mutagénesis usando ADN polimerasa Hot Star Taq[®]: la PCR mutagénica se realizó en la secuencia promotora en un volumen de reacción de 100 µl de acuerdo con [20]. La reacción contenía 12 ng de pAOX, 40 pmol de cada cebador, (P(AOX1)directo y P(AOX1) inverso), los dNTP (dGTP 200 µM, dATP 200 µM, dTTP 1 mM, dCTP 1 mM) y 5 U de ADN polimerasa Hot Star Taq[®] en condiciones de tampón apropiadas. La concentración de MgCl₂ se aumentó a 25 7 mM (normalmente 3 mM) para modificar la tasa de error de la polimerasa. La PCR se realizó en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C.

30 El kit de mutagénesis al azar GeneMorph[®] se realizó en la secuencia promotora en un volumen final de 50 µl de acuerdo con el manual proporcionado. Como molde, se usaron diferentes cantidades del vector pAOX (véase la Tabla 10). Se usaron 12,5 pmol de cada cebador, P(AOX1)directo y P(AOX1)inverso. La reacción PCR se realizó en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C, 1m 30 s) con una etapa de desnaturalización inicial de 1 min a 95°C y una etapa de extensión final de 10 min a 68°C.

35

TABLA 10

Cantidad de molde usado en la reacción PCR con GeneMorph[®]

40

Nº	frecuencia de mutación	Cantidad de pAOX	Mutaciones esperadas/kb
45 1	baja-media	12 ng	~ 3 o inferior
2	media	1,2 ng	3 - 7
3	media-alta	120 pg	7 o superior

50

55 Se realizó una primera ronda de mutagénesis con las condiciones descritas anteriormente (Taq, 3x GeneMorph[®]). Para conseguir una mayor frecuencia de mutación la reacción GeneMorph[®] n° 3 se usó como molde para una segunda ronda de PCR. Se usaron las condiciones Taq y GeneMorph[®] n° 2 y n° 3.

60 Antes de la transformación en células de *Pichia pastoris* X-33 GFP-Zeo Mut⁻ A9, todas las reacciones de PCR se precipitaron y desalinizaron como se ha descrito anteriormente. Se usó el procedimiento de transformación y regeneración convencional. La selección para promotores inducidos en medio de glucosa se realizó dispersando 150 µl de alícuotas de suspensión celular transformada sobre placas de agar MD que contenían 100-500 µg/ml de Zeocin[™] y se incubó a 30°C durante 2 días.

65

Ejemplo 1.5

Resultados y comentario

I) Caracterización del sistema indicador

Hasta ahora, se ha usado una gran diversidad de variantes de GFP en biología molecular. Aunque difieren únicamente en algunas mutaciones puntuales, sus características difieren enormemente. Además de mejorar las propiedades de plegamiento su espectro fluorescente así como sus producciones cuánticas y por lo tanto intensidades difieren bastante. Las proteínas verdes fluorescentes pueden dividirse en dos grupos principales, según su máximo de excitación: variantes GFP de tipo silvestre con un máximo de excitación a 395 nm y un máximo inferior a 470 nm, y variantes GFP cambiadas a rojo con un máximo de excitación a 480-490 nm. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, el ciclo 3-GFP pertenece al grupo de variantes GFP de tipo silvestre con un máximo de excitación a 395 nm.

Para controlar las propiedades espectrales cuando se expresan en *Pichia pastoris* se determinó el espectro de fluorescencia. La excitación global máxima del ciclo 3-GFP en GFP-Zeo es 395 nm, mientras que el segundo máximo a 478 nm es evanescente. El espectro de emisión revela un máximo de emisión de 510 nm. De las dos longitudes de onda de excitación sugeridas por el manual la de 395 nm es la preferida y se usó para las mediciones posteriores.

La auto-absorción es un fenómeno muy frecuente en espectroscopia fluorescente. A elevadas concentraciones de fluoróforo, los protones emitidos en una región solapante del espectro de absorción (excitación) pueden absorberse (transferencia de energía radiante). Se observará menor intensidad fluorescente si se produce auto-absorción (efecto de filtro de emisión interno). Esto conduce a una infravaloración de las actividades promotoras. Sin efecto de filtro interno la intensidad fluorescente aumenta de modo lineal según aumenta el fluoróforo. Por lo tanto, se ensayaron volúmenes en aumento de células de *P. pastoris* que expresan GFP-Zeo para determinar su actividad fluorescente.

Hasta 3.000 URF no pudo detectarse el efecto de filtro de emisión interno sobre el nivel celular. La auto-absorción dentro con las células, producida por la acumulación de GFP, no pudo evaluarse. Se detectó un aumento lineal en la fluorescencia durante las 72 horas completas de la fase de inducción. Por esa razón, no parece probable un efecto de filtro interno dentro de las células. Por lo tanto la acumulación de GFP-Zeo dentro del núcleo no es un problema para su cuantificación. No se produce ningún efecto de filtro interno dentro del intervalo de actividades promotoras unicopia determinadas en este estudio. Debido a la ausencia de auto-absorción la infravaloración de las actividades promotoras no es probable que suceda. El efecto de filtro interno observado por otros se produce más probablemente por el uso de una variante de GFP diferente con un cambio de Stokes mucho menor y por lo tanto un espectro de excitación y emisión solapantes. Se ha tenido cuidado al comparar los resultados de experimentos de expresión de GFP. El uso de diversas variantes de GFP con propiedades espectrales distintas, pero también con usos de codón optimizados y por lo tanto niveles de expresión muy diferentes en diferentes hospedadores de expresión complican la posibilidad de comparar los resultados de diferentes laboratorios.

II) Actividad del promotor *AOX1* a microescala

Normalmente el cultivo de células microbianas (por ejemplo levaduras, bacterias) a pequeña escala, se realiza en cultivos de matraces agitadores. La inoculación y cultivo de grandes bibliotecas microbianas en matraces agitadores es laboriosa y conlleva tiempo dando como resultado elevados costes. En los últimos años los sistemas de cultivo a microescala usando placas de microtitulación de pocillos profundos se desarrollaron como una alternativa. Debido a la manipulación en paralelo de, por ejemplo, 96 o 384 cepas/cultivos y a menos material necesario, los sistemas de microtitulación son superiores a los matraces agitadores en cuanto al esfuerzo, tiempo y por lo tanto mayor coste. Debido a varias razones, los principales inconvenientes de los sistemas de microtitulación, volumen pequeño de la muestra y una baja eficacia de oxigenación, son menos importantes: (1) avances técnicos en sistemas analíticos conducen a límites de detección inferiores de una gran cantidad de compuestos dando como resultado la necesidad de volúmenes de muestras muy bajos; (2) los métodos y dispositivos para el cultivo en placas de microtitulación de pocillos profundos también mejoran. En algunos estudios se ha demostrado que las tasas de oxigenación, y por lo tanto las condiciones de crecimiento, en las placas de microtitulación son similares a las de los matraces agitadores. También se ha demostrado que, estudios en tiempo real en el promotor *GALI* en *S. cerevisiae*, usando el ciclo-3-GFP como proteína indicadora, coinciden con estudios realizados en matraces agitadores.

El promotor *AOX1* que conduce la expresión de GFP-Zeo se estudió en placas de microtitulación de pocillos profundos como se ha descrito anteriormente. Después del crecimiento celular en glucosa continuó una fase de inducción con metanol como fuente de energía y carbono. La inducción del promotor *AOX1* con metanol en células de *Pichia pastoris* que poseen el casete de expresión PAOX1-GFP-Zeo-AOX1 TT condujo a un rápido aumento de la fluorescencia de GFP. Hasta las 72 horas la fluorescencia de GFP aumentó de manera lineal. La expresión de GFP-Zeo continuaría si se añade metanol. Si no se añade, el metanol se agota por evaporación y consumo a las 24 horas y la expresión de GFP-Zeo disminuye a un nivel desreprimido.

El aumento de la fluorescencia en GFP-Zeo también fue coincidente con la proteína GFP-Zeo y se observó por SDS-PAGE. Después de la inducción con metanol apareció una banda de proteína de aproximadamente 42 kDa que se intensificó a medida que aumentaba la fluorescencia. La fuerte banda a 42 kDa se observó en todos los clones GFP-Zeo

ES 2 356 127 T3

mientras que en el control negativo (X-33 de tipo silvestre) no apareció la banda. También en la muestra de d6*F10 de X33, después de 72 horas de inducción con metanol, se observó una banda fuerte (figura 1C, Carril 5). Aunque de manera no normalizada puede evaluarse una clara correlación entre las intensidades de las bandas de 42 kDa y los niveles de fluorescencia apropiados.

III) Sitios de unión a factores de transcripción

Como se ha descrito anteriormente, se conocen secuencias consenso para sitios de unión de diferentes factores de transcripción. El análisis de secuencia de la secuencia del promotor AOX1 reveló varios supuestos sitios de unión a factores de transcripción, con algunos aciertos de especial interés. Entre el factor de choque térmico y el elemento motivo de respuesta al estrés, se observaron sitios de unión de algunos factores de transcripción generalmente conocidos implicados en la regulación de la glucosa. Los sitios de unión más interesantes se resumen en la Tabla 11 y en la Figura 2.

TABLA 11

Sitios de unión a factores de transcripción (TF) observados dentro de la secuencia del promotor de AOX1. Los pares de bases en letras mayúsculas indican la secuencia núcleo (los 4 restos consecutivos más altamente conservados de la matriz), los pares de bases subrayados muestran un alto contenido de información (Ci > 60 de un máximo de 100)

Matriz de TF	Posición (5)*	Variante de delección	Similitud del núcleo	Similitud de la matriz	Secuencia	Sec ID N°
HAP1.01	52-66 (-902 a -888)		1,000	0,802	ctgtg- gat gtCGGAt	31
HSF.01	135 a 155 (-819 a -799)		1,000	0,784	AGAAgag- gagtg- gag- gtcctg	32
HAP234.01	193 a 205 (-761 a -749)	Δ1	1,000	0,895	caagc- CCAAtaac	33
HAP234.01	203 a 205 (-751 a -739)	Δ1	1,000	0,923	gagctCCA Atcaa	34
ABAA.01	213 a 227 (-741 a -727)	Δ1	1,000	0,949	ctcgct- CATTccaa t	35
STRE.01	279 a 287 (-675 a -667)		1,000	1,000	ccAGGGgg g	36
RAP1.01	332 a 346 (-622 a -608)	Δ2	1,000	0,845	tacAC- CCgaa- catca	37
ADR1.01	371 a 377 (-583 a -577)	Δ3	1,000	1,000	tGGGgtc	38
HSF.03	516 a 536 (-438 a -418)	Δ4	1,000	0,862	AGAAactt ccaaaagt cggc	39
HAP234.01	665 a 677 (-289 a -277)	Δ5	1,000	0,883	at- catCCAAa aag	40

ES 2 356 127 T3

Matriz de TF	Posición (5)*	Variante de delección	Similitud del núcleo	Similitud de la matriz	Secuencia	Sec ID N°
MAT1MC.01	680 a 690 (-274 a - 264)		1,000	0,901	t <u>g</u> ca <u>T</u> - <u>T</u> G <u>T</u> ctc	41
GCR1.02	699 a 713 (-255 a - 241)	$\Delta 6$	1,000	0,872	a <u>t</u> - g <u>C</u> T <u>T</u> Ccaa gattc	42
QA-1F.01	743 a 763 (- 211 a - 191)	$\Delta 7$	0,785	0,775	a <u>c</u> a <u>g</u> t- <u>t</u> aaattt <u>T</u> G <u>A</u> Tcatga	43
* La posición proporcionada se marca con respecto al punto de inicio de la traducción (ATG) del gen GFP-Zeo; las secuencias núcleo de los supuestos sitios de unión a factores de transcripción se muestran en letras mayúsculas c indica homología con la cadena complementaria						

IV) Secuencias reguladoras en genes regulados por metanol

En la bibliografía se describen diversas secuencias que están implicadas en la regulación de genes inducibles por metanol. Basándose en el análisis de delección del promotor de *AOX2* de *P. pastoris* se describieron tres regiones reguladoras, dos regiones de activación negativa (USR1 y USR2, secuencias de represión aguas arriba) y un dominio de activación positivo (UAS, secuencia de activación aguas arriba) [3]. También se describieron dos secuencias de activación aguas arriba (UAS1 y UAS2) y un sitio de unión al represor (USR1), para el promotor *MOX* de *H. polymorpha* [8].

V) Construcciones de delección del promotor de *AOX1*

Basándose en el análisis de factores de transcripción y en el alineamiento de secuencias múltiples, se seleccionaron 9 regiones promotoras para la delección por PCR de extensión por solapamiento, como se ha descrito anteriormente. Las construcciones de delección del promotor *AOX1* se clonaron en el vector pAOX para sustituir el promotor 5 de "AOX1 de tipo silvestre" con respecto al gen indicador GFP-Zeo. Los plásmidos se linealizaron y se integraron en el genoma de *Pichia pastoris*.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 356 127 T3

TABLA 12

Secuencias delecionadas en las construcciones del promotor de AOX1

Construc	Posición*		Secuencia	Sec ID N°
	Extremo 5'	Extremo 3'		
PAOX1Δ1	170 -784	235 -719	tttgccatcgaaaaaccagcccagt- tattgggcttgattggagctcgct- cattccaattccttcta	44
PAOX1Δ2	304 (-650)	350 (-604)	ttatttccgaatgcaacaagctccgc- attacacccgaacatcactcc	45
PAOX1Δ3	364 (-590)	393 (-561)	ctgagtggtgggtcaaatagtttcat- gttc	46
PAOX1Δ4	509 (-445)	551 (-403)	gtcaaaaagaaacttccaaaagtcg- gcataccgtttgtcttgt	47
PAOX1Δ5	625 (-329)	683 (-271)	ccggtgcacctgtgc- cgaaacgcaaattggggaaacac- ccgctttttggatgattatgca	48
PAOX1Δ6	694 (-260)	723 (-231)	attgtatgcttccaagattctggtgg- gaat	49
PAOX1Δ7	729 (-225)	763 (-191)	tgatagcctaacgttcatgat- caaaatttaactgt	50
PAOX1Δ8	784 (-170)	800 (-154)	aatatataacagaagg	51
PAOX1Δ9	823 (-131)	861 (-93)	tttttttatcatcattattagct- tactttcataattgcg	52
*Las posiciones proporcionadas se marcan con respecto a la Sec ID N° 1				

Los integrantes se analizaron para determinar la expresión de GFP-Zeo y para la integración de la secuencia promotora correcta delante del gen GFP-Zeo, como se ha descrito anteriormente. Se analizaron integrantes unicopia con mayor detalle para determinar sus niveles de expresión de GFP-Zeo en diferentes fuentes de carbono a microescala. En ninguna construcción (de delección y de tipo silvestre) pudo detectarse fluorescencia de GFP siempre que la glucosa o el glicerol estuvieran presentes en el medio (con y sin metanol). Después de la privación de carbono, representando condiciones de desrepresión, se observó un ligero aumento de la fluorescencia de GFP. En comparación con el tipo silvestre, las variantes del promotor mostraron diferencias notables (Figura 3). En condiciones de desrepresión, se observó una disminución significativa de la actividad promotora en 6 construcciones (Δ3, Δ4, Δ5, Δ7, Δ8 y Δ9, véase la Figura 3). Δ1 poseía actividad de tipo silvestre mientras que las construcciones Δ2 y Δ6* dieron como resultado una expresión significativamente mayor de GFP-Zeo. El nivel de expresión de la última fue notablemente mayor que el nivel del tipo silvestre.

Tras la inducción con metanol, todas las variantes mostraron una actividad promotora disminuida significativa con una sola excepción: Δ1 que dio como resultado aproximadamente el 20% de mayor actividad en comparación con el tipo silvestre. La disminución en cuanto a la actividad en el resto de variantes es bastante significativa como puede observarse en la Fig 4.

En la Tabla 3 se resume la actividad promotora de todas las variantes y construcciones de tipo silvestre normalizadas sobre la actividad de tipo silvestre inducida por metanol.

TABLA 13

Intensidad de fluorescencia de variantes del promotor de AOX1 a microescala. Los datos representan DT media de 4 mediciones independientes. La intensidad de fluorescencia después de 72 h de inducción con metanol del promotor WT (100%) es de 987 ± 81 . No se detectó fluorescencia mientras que hubiera glucosa en el medio

Construcción	Intensidad de fluorescencia relativa [%]	
	Desrepresión	Metanol
PAOX1	$2,8 \pm 0,1$	100
PAOX1 Δ 1	$3,0 \pm 0,5$	120 ± 12
PAOX1 Δ 2	$4,4 \pm 0,8$	40 ± 3
PAOX1 Δ 3	$0,7 \pm 0,2$	68 ± 8
PAOX1 Δ 4	$1,9 \pm 0,1$	72 ± 4
PAOX1 Δ 5	$0,23 \pm 0,04$	30 ± 4
PAOX1 Δ 6*	$9,1 \pm 0,6$	42 ± 2
PAOX1 Δ 7	$2,2 \pm 0,4$	$31,3 \pm 0,5$
PAOX1 Δ 8	$0,3 \pm 0,2$	$17,1 \pm 0,7$
PAOX1 Δ 9	$1,3 \pm 0,1$	61 ± 3

La delección de la caja TATA en la construcción Δ 8 dio como resultado una destrucción masiva de promotor con una fuerte disminución de la actividad en condiciones de desrepresión y de inducción de aproximadamente el 90% y el 80% respectivamente. Eliminando el comienzo del inicio de la transcripción, determinado experimentalmente (Ellis, S.B., *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1985) 5:1111-1121) (Δ 9), no se observó dicho efecto fuerte sobre el nivel de expresión. Esta es una de las mejores construcciones de delección después de la inducción con metanol. Como se esperaba, la caja TATA tiene un fuerte impacto sobre el nivel de la transcripción. Por el contrario, parece que el comienzo del inicio de la transcripción no es tan importante como la caja TATA. Otra región en la distancia definida con respecto a la caja TATA puede actuar como un inicio de la transcripción después de la delección de la original. Sobre el efecto de esta delección, en varias fases del proceso de expresión (por ejemplo, inicio de la transcripción, estabilidad del ARNm, inicio de la traducción), pueden realizarse conjeturas ya que el extremo 5' del ARNm se cambió por la delección.

Después de la desrepresión, solo dos construcciones, Δ 2 y Δ 6*, mostraron un nivel de expresión significativamente mayor. En las secuencias delecionadas se incluyen los supuestos sitios de unión a factores de transcripción de Rap1p y Gcr1p. Además, el supuesto sitio de unión a factores de transcripción de QA-1F está muy próximo a las secuencias de Δ 6* delecionadas. Cabe destacar que se sabe que los sitios de unión de Rap1p y Gcr1p actúan de manera sinérgica cuando están presentes en las secuencias promotoras [21]. El factor de transcripción general de Rap1p tiene diversas funciones celulares (por ejemplo, estructura del telómero, apareamiento, traducción, glucólisis) dependientes del contexto de secuencia de sus sitios de unión y de los factores de transcripción apropiados [22-24]. Como se ha mencionado anteriormente, Gcr1p es el principal elemento de regulación y coordinación de genes glucolíticos y es absolutamente necesario para el alto nivel de expresión en *S. cerevisiae*. Los sitios de unión de Rap1p y Gcr1p se encuentran en estrecha proximidad en la región núcleo de la secuencia de activación aguas arriba (UAS) de genes glucolíticos y la unión de Gcr1p se mitiga plegando el ADN por Rap1p. Por otro lado un sitio de unión adyacente a Rap1p no es un requisito indispensable para la activación de genes dependientes de Gcr1p. Parece que Gcr1p puede facilitar la unión a sus sitios de unión cuando existe una mayor cantidad de cajas CT. Aunque se ha descrito una clara interacción de Rap1p con Gcr1p así como de Ccr1p con Gcr1p, se sugiere que algunos otros factores interaccionan con Gcr1p y/o Rap1p modulando la actividad del complejo. Durante las 3 últimas décadas se consiguió un amplio conocimiento sobre el mecanismo de inducción.

En la secuencia del promotor de AOX1, no pudo observarse la estrecha proximidad indispensable descrita de los sitios de unión de Gcr1p y Rap1p en UAS funcionales descritas anteriormente. Por el contrario, los dos sitios de unión están a 367 pb de distancia. Entre el supuesto sitio de unión de Gcr1p, su secuencia núcleo CTTCC está presente dos veces en la secuencia del promotor de AOX1, pero ninguna de ellas está inmediatamente adyacente al sitio de unión de Rap1p u otro motivo CTTCC. Por lo tanto parece que no es probable una acción sinérgica de estos dos sitios de unión como se ha encontrado en muchos genes glucolíticos. Dado que las supuestas funciones de Rap1p y Gcr1p son proteínas represoras para AOX1 en condiciones de desrepresión, es posible un nuevo modo de (inter-) acción de las dos proteínas para esta supuesta nueva función celular.

Se destaca una implicación de la delección de $\Delta 6^*$ (incluyendo el supuesto sitio de unión de Gcr1p) en la represión, después de la privación de carbono, por la observación de cepas multicopia con expresión muy alta de GFP-Zeo sin inducción con metanol. En la Fig. 5 se muestra la expresión de GFP-Zeo del mejor clon de la serie $\Delta 1$ - $\Delta 9$, denominado X-33 d6*F10 de *P. pastoris*. Después de la desrepresión, en esta cepa multicopia $\Delta 6^*$, la expresión de GFP-Zeo es aproximadamente un 10% superior (60h a microescala) que en una cepa unicopia del promotor de tipo silvestre (X-33 GFP-Zeo D2) después de la inducción con metanol. El nivel de expresión de X-33 d6*F10 de *P. pastoris*, después de la inducción con metanol, también es mucho más alto que el de una cepa multicopia con un promotor de tipo silvestre (X-33 GFP-Zeo E2).

Las regiones del promotor de *AOX1* y *DAS1* de *P. Pastoris* y de *MOX* en *H. polymorpha* promueven la expresión de la enzima indicadora beta-galactosidasa (lacZ de *E. coli*) en *S. cerevisiae* [9]. El modelo de regulación de estos genes en *S. cerevisiae* es similar al de sus hospedadores naturales: la glucosa reprime la expresión del gen. En condiciones de privación de carbono la expresión se desreprime ligeramente y el glicerol como fuente de carbono induce la expresión. Los niveles de beta-galactosidasa expresada bajo el control de las regiones reguladoras de *AOX1* y *DAS1* en *S. cerevisiae* son comparables con los obtenidos con los fuertes promotores de *S. cerevisiae* *CYC1* (constitutivo) y *GAL2* (inducible) [9]. Se ha demostrado que la expresión conducida por el promotor de *MOX* está también inducida por etanol, metanol y ácido oleico en *S. cerevisiae*. Otro hallazgo muy importante es la implicación de Adr1p en la desrepresión/inducción del promotor. Adr1p, un efector positivo de ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2) y algunas proteínas peroxisomales en *S. cerevisiae* [25], también es un efector positivo del promotor de *MOX* cuando no hay glucosa en el medio.

Como se ha mencionado anteriormente el modelo de regulación de los genes de *AOX1* y de *MOX* es significativamente diferente en sus hospedadores naturales debido a la desrepresión de *MOX* cuando el glicerol está presente. El uso de la región promotora de *AOX1* en *H. polymorpha* reveló que el promotor de *AOX1* no estaba reprimido por glicerol en el hospedador heterólogo [26]. Por lo tanto, el promotor heterólogo de *AOX1* parece regularse como el promotor homólogo de *MOX*. Estos resultados sugieren que las diferencias significativas en cuanto al modelo de regulación entre *P. pastoris* y *H. polymorpha* se deben a la respuesta transcripcional global con respecto a diferentes fuentes de carbono en estas dos levaduras. Es decir, aunque las maquinarias de represión del glicerol y la glucosa sean (parcialmente) idénticas en *P. pastoris*, en *H. polymorpha* (como en *S. cerevisiae*) la situación es diferente y el glicerol no usa la maquinaria de represión de la glucosa.

Dos de los tres supuestos sitios de unión a HAP2/3/4/5 encontrados en la secuencia promotora de *AOX1* se encuentran dentro de la construcción de delección $\Delta 1$ y el tercero en $\Delta 5$. La delección de secuencia de $\Delta 1$ da como resultado un aumento en la actividad promotora después de la inducción con metanol aunque no se observaron efectos sobre el nivel de desrepresión del promotor. Por el contrario, la delección de $\Delta 5$ da como resultado una fuerte disminución en la actividad promotora en condiciones de desrepresión así como de inducción. En la delección de $\Delta 1$ se encontró un supuesto sitio de unión a abaA en *Aspergillus nidulans*. El producto del gen abaA es un activador transcripcional que está implicado en el desarrollo de conidióforos (aparato reproductor asexual) en *A. nidulans* [27]. Dado que todos los supuestos sitios de unión son posibles secuencias activadoras [27], su delección debe tener un efecto negativo sobre el nivel de expresión como se observa en la construcción $\Delta 5$. Debido a que las dos delecciones son muy largas, otro sitio de unión podría ser el responsable del efecto observado. De hecho esta delección de $\Delta 1$, que tiene el efecto opuesto sobre el nivel de expresión, indica que uno de los supuestos sitios de unión es un motivo represor o que otro sitio de unión está presente, lo cual supera el efecto de delección de los supuestos sitios de unión HAP y abaA, aumentando, por tanto, el nivel de expresión.

Sin embargo, se sabe que el complejo HAP es responsable de la regulación positiva de los genes implicados en el metabolismo respiratorio y energético *S. cerevisiae*. La regulación de la respiración está controlada por el nivel de oxígeno así como por la fuente de carbono presente en el medio, ambos mediados por el complejo Hap. En la levadura fermentativa *S. cerevisiae*, varios genes y por lo tanto funciones de la cadena respiratoria así como el ciclo del ácido cítrico, están reprimidos por la glucosa. La represión de la respiración por la glucosa está parcialmente mediada por el complejo Hap, en concreto por la ausencia de Hap4p siempre que la glucosa esté presente. Por otro lado, la regulación dependiente de oxígeno parece que está regulada por Hap1p [28]. Se aislaron homólogos de los genes del complejo Hap en las levaduras respiratorias *K. lactis*. Los genes implicados en la respiración se han expresado constitutivamente en levaduras respiratorias, incluso en presencia de glucosa. Hasta ahora, casi todos los genes de la cadena respiratoria han demostrado regularse independientemente del complejo Hap [29]. El papel del complejo Hap parece coordinarse con la asimilación de carbono y nitrógeno, como también se ha observado en *S. cerevisiae* [30] y *Aspergillus nidulans* [29].

La primera etapa en la ruta de utilización del metanol, principalmente catalizada por el producto génico de *AOX1* en *P. pastoris*, es el consumo de oxígeno. La mayoría de los genes implicados en el metabolismo energético y casi todos los genes que codifican enzimas que consumen oxígeno, se regulan por oxígeno, principalmente por Hap1p y/o Hap2/3/4/5p [28]. Cuando crecen en metanol, como única fuente de energía y carbono, la ruta de utilización del metanol da como resultado la asimilación de carbono y producción de energía. Una implicación del motivo de reconocimiento del complejo Hap TTCAA en la regulación del promotor de *AOX1* realiza un sentido intuitivo.

La construcción $\Delta 4$, que incluye un segundo supuesto sitio de unión a HSF, da como resultado un 30% de disminución de la actividad promotora después de desrepresión y de inducción. Por lo tanto, HSF es un agente intensificador general de la expresión génica de *AOX1* en condiciones de desrepresión así como de inducción. En *S. cerevisiae*, di-

ES 2 356 127 T3

versas condiciones de estrés como choque térmico, estrés oxidativo y privación de glucosa conducen a la activación de HSF. También se ha demostrado que la proteína quinasa Snf1p, uno de los “principales interruptores metabólicos”, está implicada en la fosforilación y por lo tanto la activación de HSF después de la privación de carbono [31]. Por lo tanto se produce una implicación de HSF en la activación completa de *AOX1* después de la privación de glucosa (con o sin inducción).

En la técnica anterior, se describen estudios de expresión sobre el promotor de *AOX*, usando versiones truncadas, así como variantes con secuencias delecionadas [32, 33].

TABLA 14

Resultados de los estudios del promotor por Inan et al. [32,33]; la inducción se realizó con metanol al 0,5%, como fuente de carbono, la represión con metanol al 0,5% y etanol al 0,5%; Las posiciones iniciales indican el extremo 5' de la secuencia en el promotor de AOX1 con respecto al punto de inicio de la traducción (ATG)

Fragmento del promotor	Deleción por referencia a la SEC ID N° 1	Actividad relativa [%]	
		inducida	reprimida
InanABCDEF	-	100	3,1 ± 0,3
Inan_BCDEF	7 a 152 (-947 a -802)	76 ± 5	1,9 ± 0,2
Inan_CDEF	1 a 292 (-947 a -661)	49 ± 4	2,2 ± 0,5
Inan_DEF	1 a 432 (-947 a -521)	14 ± 3	1,3 ± 0
Inan_EF	1 a 559 (-947 a -394)	24 ± 7	1,8 ± 0

ES 2 356 127 T3

Fragmento del promotor	Deleción por referencia a la SEC ID Nº 1	Actividad relativa [%]	
		inducida	reprimida
Inan_F	1 a 798 (-947 a -245)	7 ± 2	1,8 ± 0,2
InanA_CDEF	153 a 292 (-801 a -661)	63 ± 3	2,1 ± 0,2
InanAB_DEF	293 a 432 (-660 a -521)	109 ± 12	3,8 ± 0,4
InanABC_EF	433 a 559 (-520 a -394)	128 ± 6	5,0 ± 0,6
InanABCD_F	560 a 798 (-393 a -245)	16 ± 1	0,8 ± 0,2

La construcción Inan_BCDEF, que comienza en 153 (-801) (Tabla 14) reveló un sitio de unión de al menos una proteína activadora aguas arriba de 153 (-801). Los candidatos para este sitio de unión al activador son los sitios de unión de Hap1p (52 a 66, -902 a -888) y HSF (135 a 155, -819 a -799) en la cadena complementaria encontrada con MatInspector. El truncamiento en el sitio de restricción SacI (210-215 (-744 a -739)) dio como resultado un promotor que apenas conseguía la actividad del promotor de tipo silvestre (Geoff Lin Cereghino, Poster, Sixth Meeting on "Current Topics in Gene expression and Proteomics", San Diego, octubre 19-22, 2003). Para conseguir el nivel del promotor de tipo silvestre con la construcción del promotor truncado con SacI (pHWG0, Geoff Lin Cereghino, poster), puede estar presente un segundo sitio de unión para una proteína represora aguas arriba de 210 (-744) cuya deleción tiene el mismo impacto, pero en dirección opuesta, sobre la actividad del promotor. La situación de la proteína represora está entre 169 (-784) y 210 (-744) porque la construcción Δ1 (Δ 169 (-784) a 234 (-719)) contiene un sitio unión al represor. La deleción de Δ1 da como resultado un aumento del 20% de la actividad promotora (Tabla 14) que está en el intervalo de la disminución por deleción del sitio de unión de la proteína activadora.

Por comparación con Δ4 (Δ 508 (-445) a 550 (-403)) la situación del sitio de unión al represor puede refinarse adicionalmente con respecto a una secuencia entre 433 (-520) y 508 (-445) porque la deleción Δ4 incluye un factor de transcripción de acción positiva, HSF en 516 a 536 (-438 a -418). Si el HSF de acción positiva (si se trata de HSF) se localiza dentro de la región propuesta, puede sugerirse un efecto más fuerte del sitio de unión al represor entre 433 y 508 (-520 y -445). Si el sitio de unión para HSF se localiza en la región entre 508 y 536 (-445 y -418) otro sitio de unión al activador se localiza entre 536 y 560 (-418 y -393) si esto no es así, es probable que sea el mismo sitio de unión. Al igual que la variante InanABCD_F (Δ 560 a 709 (-393 a -245)) con una actividad de tipo silvestre solo del 16%, también la construcción Δ5 (624 a 682 (-329 a -271)) da como resultado una disminución de aproximadamente el 70% del nivel de tipo silvestre. Como era de esperar, la deleción del fragmento Inan B a partir del promotor de longitud completa (que da como resultado InanA_CDEF) así como a partir de Inan_BCDEF (que da como resultado Inan_CDEF) da como resultado una disminución del 63 al 64% del fragmento más largo, respectivamente. En cambio, mientras que la deleción del fragmento C, a partir del promotor de longitud completa, da como resultado un aumento de aproximadamente el 10% de la actividad promotora, la deleción del fragmento Inan_CDEF truncado conduce a una disminución del 49 al 14% (Tabla 14). La explicación es una unión sinérgica de factores de transcripción dependientes del contexto de sus sitios de unión. Entre 713 y 760 (-241 a -194) se localiza un último sitio de unión a proteína activadora (Geoff Lin Cereghino, Poster San Diego). De nuevo, mediante la construcción Δ7 (Δ 729 a 763, -225 a -191) la localización del activador podría afinarse aguas abajo hasta 729 (-225).

Concluyendo, se observaron varias regiones que tenían un fuerte impacto sobre el nivel de expresión del promotor de *AOX1*. Combinando todos los sitios reguladores conocidos a partir del ejemplo proporcionado en este documento y a partir de otros autores, excluyendo las regiones que contienen la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, en la secuencia promotora de P_{AOX1} al menos existen 10 sitios reguladores.

Los datos proporcionados revelan la regulación orquestada del promotor de *AOX1*, se necesitan diversos factores para unirse al ADN para un nivel de expresión máximo. En condiciones de inducción varios factores de la transcripción de acción positiva (activadores) se unen al ADN mientras que la mayoría de las proteínas represoras no se unen dando como resultado un alto nivel de expresión. En condiciones de desrepresión, la actividad del promotor alcanza solo un pequeño porcentaje (~ 3%) del nivel inducido. Probablemente esto se debe a proteínas menos activadoras y más represoras que se unen a la región promotora. En condiciones de represión puede suponerse que ni activadores ni diversos represores se unen al ADN con un aumento adicional de la proporción represor/activador en condiciones de represión.

Para el promotor de ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2) de *S. cerevisiae*, reprimido por glucosa, se ha demostrado que la unión de proteínas activadoras (por ejemplo Adr1p), inmediatamente adyacentes a los nucleosomas, conduce a desestabilización y por lo tanto la reorganización de la cromatina después de la desrepresión. La reorganización tiene lugar en la región de la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción aumentando por tanto su accesibilidad. Por lo tanto, debido a la formación de un complejo de pre-iniciación estable de mayor accesibilidad, se produce un aumento de la actividad promotora con respecto a un nivel basal. Entre la unión de diversos factores de transcripción para potenciar la expresión dirigida por P_{AOX1} , puede suponerse un mecanismo similar, al menos para la desrepresión. Considerando todos los datos y supuestos en conjunto, la regulación del promotor de *AOX1* es muy compleja y los supuestos sitios de unión de diversos factores de transcripción (de acción positiva y negativa) revelan una maquinaria muy coordinada que es capaz de integrar una amplia diversidad de señales para la regulación del promotor de *AOX1*.

VI) Mutagénesis por PCR del promotor de *AOX1*

En este documento se ha demostrado que mutaciones específicas dentro de secuencias núcleo de los sitios de unión a factores de transcripción dan como resultado modificaciones significativas de su fuerza efectora. Supuestamente, algunas proteínas activadoras y represoras actúan sobre el promotor de *AOX1* para dar como resultado su muy fuerte regulación (casi sin actividad con glucosa, actividad muy alta con metanol). Por lo tanto la mutagénesis aleatoria del promotor de *AOX1* debe dar como resultado varias variantes del promotor con actividades de los sitios de unión a represor destruidas o reducidas. Se realizó una serie de reacciones PCR con diferentes tasas de mutación. Las variantes promotoras resultantes se transformaron dentro de la cepa GFP-Zeo Mut^S A9 de *P. pastoris* en la que el gen *AOX1* se sustituyó por la cepa GFP-Zeo. La sustitución del promotor de *AOX1* de tipo silvestre por variantes promotoras mutagenizadas debe ocurrir a una tasa particular. La selección de variantes promotoras con mayor tasa de expresión, cuando está presente la glucosa en el medio, se realizó sobre placas de agar MD-Zeo.

La dispersión sobre placas de agar MD que contenían 100 µg/ml de ZeocinTM dio como resultado placas cubiertas con células de *Pichia pastoris* y sin colonias individuales evidentes. Parece que la presión de selección no fue suficiente para reprimir el crecimiento de la cepa de tipo silvestre. Aunque no pudo detectarse fluorescencia en la cepa GFP-Zeo Mut^S A9 de *P. pastoris*, cuando la glucosa estaba presente, algunas proteínas GFP-Zeo pudieron expresarse en la célula confiriendo resistencia a ZeocinTM. Para ensayar mayores concentraciones de ZeocinTM para la inhibición del crecimiento de la cepa GFP-Zeo Mut^S A9 se realizaron ensayos por goteo como se ha descrito anteriormente.

Como puede observarse claramente en la Fig. 6 el aumento a 200 µg/ml no disminuyó la viabilidad celular (en comparación con 100 µg/ml) de las cepas de *P. pastoris* que contenían un gen GFP-Zeo bajo el control del promotor de *AOX1*, pero el aumento a 500 µg/ml sí lo hizo. Era de esperar que la mutagénesis del promotor diera como resultado únicamente niveles de expresión ligeramente aumentados por lo tanto una presión de selección de 500 µg/ml de ZeocinTM parece ser demasiado alta. Por último, para todas las exploraciones posteriores de variantes promotoras por mutagénesis, se seleccionaron 350 µg/ml.

Debido a la regulación transcripcional muy compleja con muchas regiones promotoras involucradas, una estrategia de mutagénesis aleatoria usando una tasa alta de mutagénesis, es ventajosa.

Ejemplo 2

Generación de delecciones promotoras

Basándose en los resultados del ejemplo 1 se generó una segunda generación de variantes por delección. A diferencia de la primera serie, en estas nuevas construcciones de delección, solo se deleccionaron tramos de secuencias pequeños y específicos de los supuestos sitios de unión a factores de transcripción (5-15 pb) (Tabla 15).

Tabla 15: Efectos de deleciones de sitios de unión a factores de transcripción específicos sobre el nivel de expresión después de desrepresión (privación de glucosa) e inducción con metanol. También se indican las mutaciones $\Delta 1$ - $\Delta 9$ así como las combinaciones de mutaciones individuales. Todos los números son actividades relativas del promotor en comparación con la actividad del promotor de tipo silvestre en las mismas condiciones.

Deleción	Tramo de la Sec ID N°: 1	Región	Deleción (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
Δ Hap1	-900 a -896	Inan A	GGCATCCGACATCCA	Expresión aumentada en condiciones de inducción
Δ Hsf_1	-812 a -805	Inan A	GGACCC <u>TCCACTCCTCTTC</u>	Generación de cepas multicopia, expresión aumentada en condiciones de inducción
$\Delta 1$	-784 a -719	Inan B	CCACTTTTGGCATCGAAAAACCCAGCCCGCTTATTGGGCTTGATTG- <u>GAGCTCGCTCATTCCTCAATTCTCTCTA</u> TTAGG	Expresión aumentada en condiciones de inducción
Δ Hap2345_1	-758 a -754	Inan B, $\Delta 1$	CAGTTATTGGGCTTG	Generación de cepas multicopia
Δ Hap2345_2	-748 a -744	Inan B, $\Delta 1$	GCTTGATTGGAGCTC	Generación de cepas multicopia
Δ abaA	-735 a -730	Inan B, $\Delta 1$	TCGCTCATTCGAATTC	Generación de cepas multicopia

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Delección	Tramo de la Sec ID N°: 1	Región	Delección (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
ΔStre	-673 a -669	Inan B	<u>TGGCCGCCCTGGCGA</u>	Expresión aumentada en condiciones de inducción Mayor expresión en condiciones de desrepresión Generación de cepas multicopia
Δ2	-650 a -604	Inan C	TTTGT <u>TTATTCGGAATCCAAACAGCTCCGCATTACACCCGAACAT-</u> <u>CACTCCAGATG</u>	
ΔRap1	-619 a -615	Inan C, Δ2	<u>ATTACACCCGAACAT</u>	
Δ3	-590 a -561	Inan C	<u>GCTTTCGAGTGTGGGTCAAAATAGTTTCATGTTCCTCCCAA</u>	
ΔAdr1	-583 a -577	Inan C, Δ3	<u>GACTGTGGGGTCAAATA</u>	
Δ4	-445 a -403	Inan D	<u>AGTTGACAAAGACAAACGGTATGCCGACTTTTG-</u> <u>GAAGTTTCCTTTTTCGACTTGGT</u>	Generación de cepas multicopia
ΔHsf_2	-437 a -430	Inan D, Δ4	<u>AAAAAGAAACTTCCAAAA</u>	
Δ5	-329 a -271	Inan E	<u>GAACCCCGGTGCACCTGTCCGAAACGCAATGGGAAACAC-</u> <u>CCGCTTTTGGATGATATATGCAATTGTC</u>	Generación de cepas multicopia
ΔHap2345_3	-286 a -282	Inan E, Δ5	<u>CGCTTTTGGATGAT</u>	
ΔMat1MC	-271 a -267	Inan E, Δ5 °	<u>TATGCATTGCTCTCCA</u>	

65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Delección	Tramo de la Sec ID N°: 1	Región	Delección (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
Δ6	-260 a -231	Inan E & F	TCCACATTTGTTATGCTTCCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	Mayor expresión en condiciones de desrepresión, generación de superclones con elevada expresión en condiciones de desrepresión
Δ6*	-260 a -231	Inan E & F	TCCACATTTGTTATGCTTCCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	
	-217 a -216	Inan F	TAGCCTAACGTT	
ΔGcr1	-252 a -248	Inan E, Δ6	GTATGCTTCCCAAGAT	Generación de cepas multicopia
Δ7	-225 a -191	Inan F	ACTGCTGATAGCCTAACGTTCAATGATCAAAAATTTAACTGTTCTAA	Generación de cepas multicopia, actividad aumentada en condiciones de desrepresión Actividad aumentada en
ΔQA-1F	-207 a -193	Inan F, Δ7	TTCAATGATCAAAAATTTAACTGTTCT	
	-218 a -213			

Delección	Tramo de la Región	Delección (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
ΔQA-1Fzus	Sec ID Nº: 1		
	-207 a - 193	Inan F, Δ7 ATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAAATTTAACTGTTCT	condiciones de desrepresión
	-758 a - 754	Inan B, Δ1 CAGTTATTGGGCTTG AAAAAGAAACTTCCAAAA	Generación de cepas multicopia
	-437 a -430	Inan D. Δ4 CAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCT	
ΔHsf_2_dHap2345_1	-758 a -754	Inan B, Δ1 AAAAAGAAACTTCCAAAA	
	-747 a - 745	Inan B, Δ1	
	-437 a - 430	Inan D, Δ4	
	-437 a 430	Inan D, Δ4 AAAAAGAAACTTCCAAAA TATGCATTGCTCTCCA	Generación de cepas multicopia
ΔHsf_2_Mat1MC	-271 a - 267	Inan E, Δ5° ACAGCAATATATAAAACAGAGGAAGCT	
	-170 a -154	Inan F	
	-131 a -93	Inan F	
		ACCTTTTTTTTATCATCATTAATTAGCTTACTTTCATAAT- TGGGACTGG	

65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Delección	Tramo de la Sec ID N°: 1	Región	Delección (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
$\Delta 2\Delta 6$	-650 a -604	Inan C	<u>TTTGTATTTCGGAATGCAACAAGCTCCGCAATTACACCCGAACAT-</u> <u>CAC</u> <u>TCCAGATG</u>	Generación de cepas multicopia
	-260 a -231	Inan E	<u>TCCACATTGTATGCTTCCAAAGATTCTGGTGGGAATACTGC</u>	
		& F		
$\Delta 736-41$	218 a -213	Inan F,	<u>ATAGCCTAACGTTTCAT</u>	
		$\Delta 7$		
$\Delta 737-38$	-217 a -216	Inan F,	<u>TAGCCTAACGTT</u>	
		$\Delta 7$		
$\Delta \text{InD-d4m}$	-402 a -394	Inan D	<u>CTTGTTTGGTATTGATTGA</u>	
$\Delta \text{D-d4}$	-520 a -446	Inan D	<u>CTTGGAACCTAATATGACAAAAAGCGTGATCTCATCCAAGAT-</u> <u>GAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGCTTGG</u>	
$\Delta 1-1$	-784 a -763	Inan B,	<u>CCACTTTTGGCCATCGAAAAACCCAGCCCAAGTTA</u>	
		$\Delta 1$		
$\Delta 1-2$	-762 a -741	Inan B,	<u>AGCCCCAGTTATTGGGCTTGATGGAGCTCGCT</u>	
		$\Delta 1$		
$\Delta 1-3$	-740 a -719	Inan B,	<u>GGAGCTCGCTCATTCCAATTCCCTTCTATTAGG</u>	
		$\Delta 1$		
$\Delta 1\text{-SacI}$	-762 a -744	Inan B,	<u>CCACTTTTCCCATCGAAAAACCCAGCCCAAGTTATTGGCCTTGAT-</u> <u>TGGAGCTC</u>	
		$\Delta 1$		
Ohi, et al UAS de AOX2	-228 a -199	Inan F,	<u>AAATCTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAAATAATATAC</u>	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Deleción	Tramo de la Sec ID N°: 1	Región	Deleción (en negrita, subrayada) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
		$\Delta 1$		
Ohi, et al UAS de AOX2	-369 a -337	Inan E	TAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTTAATC	
Ohi, et al, URS2 de AOX2	-333 a -294	Inan E	<u>TTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGTGCCGAAACGCCAAATGGGGAACACC</u> CGC	

*Materiales y métodos*a) *Mutagénesis*

Todas las delecciones se introdujeron usando el protocolo de mutagénesis dirigida en dos etapas de acuerdo con Wang *et al.* [34]. En una primera etapa se evaluaron dos reacciones individuales (una para un cebador directo y una para un cebador inverso) (100 ng de molde de pAOX, 15 pmol de cebador, 200 pM de cada dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 2,5 U de polimerasa *PfuUl-tra*TM en un volumen de 50 μ l en condiciones de tampón apropiadas). Se combinaron 25 μ l de estas 2 reacciones de PCR y se realizó una segunda etapa de reacción PCR.

Se añadió 1 μ l de la enzima de restricción *DpnI* (10 u/pl) a 30 μ l de la segunda etapa de reacción PCR y se incubó durante 1 h a 37°C. Se transformaron 1-5 μ l de la reacción PCR, digerida con *DpnI*, en células de *E. coli* electrocompetentes [16] y se sembraron en placa sobre placas de LB-Amp después de un tiempo de regeneración de 1 h en medio SOC.

TABLA 16

Cebadores para mutagénesis dirigida de delecciones de sitios de unión a factores de transcripción

Delección	Nombre	Secuencia(5'-->3')	SEC ID
Hap1	Hap1dir	GAATGAAACCTTTTTGCCATA- TCCACAGGTCCATTCTCAC	53
	Hap1inv	GAATGGACCTGTGGATATGGCAAAAAG- GTTTCATTCAACC	54
Hsf_1	Hsf 1dir	CCGTTGCAAACGCAG- GACCTCTTCTCCTCAACACCCAC	55
	Hsf 1inv	GTGTTGAGGAGAAGAGGTCCT- GCGTTTGCAACGGTCTG	56
Hap2345_1	Hap2345 1dir	CGAAAAACCAGCCCAGTTGCTTGATTG- GAGCTCGCTCATTCC	57
	Hap2345 1inv	GAGCGAGCTCCAATCAAGCAACTGG- GCTGGTTTTTCGATG	58
Hap2345_2	Hap2345 2dir	CAGCCCAGTTATTGGGCT- TGAGCTCGCTCATTCCAATTCC	59

ES 2 356 127 T3

Delección	Nombre	Secuencia(5'-->3')	SEC ID
	Hap2345 2inv	GGAATTGGAATGAGCGAGCTCAAGC- CCAATAACTGGGCTG	60
ABAA	ABAAdir	GGCTTGATTG- GAGCTCGCTAATTCCTTCTATTAGGC- TAC	61
	ABAAinv	GTAGCCTAATAGAAGGAATTAGC- GAGCTCCAATCAAGCC	62
Stre_1	Stre 1dir	GCCTGTCTATCCTGGCCGGCGAG- GTTTCATGTTTGTATTATTC	63
	Stre 1inv	CAAACATGAACCTCGCCGGCCAG- GATAGACAGGCTAATAAAG	64
Rap1	Rap1dir	GCAACAAGCTCCGCATTACAACAT- CACTCCAGATGAGG	65
	Rap1inv	CCTCATCTGGAGTGATGTTGTAATGCG- GAGCTTGTTGC	66
Adr1	Adr1dir	CCAGATGAGGGCTTTCTGAGT- GAAATAGTTTCATGTTCCC	67
	Adr1inv	GGGAACATGAACTATTTCACT- CAGAAAGCCCTCATCTGG	68
Hsf_2	Hsf 2dir	GCCAGTTGGTCAAAAACAAAAGTCG- GCATACCGTTTGTC	69
	Hsf 2inv	CGGTATGCCGACTTTTGTGTTTTGAC- CAACTGGCCGTTAGC	70
Hap2345_3	Hap2345 3dir	CAAATGGGGAAACACCCGCTTATGAT- TATGCATTGTCTCCAC	71
	Hap2345 3inv	GAGACAATGCATAATCATAAGCGGGT- GTTTCCCCATTTGCG	72
Mat1MC	Mat1MCdir	GCTTTTTGGATGATTATGCCTCCACAT- TGTATGCTTCCAAG	73

ES 2 356 127 T3

Delección	Nombre	Secuencia(5'-->3')	SEC ID
	Mat1MCinv	CTTGAAGCATACAATGTGGAG-- GCATAATCATCCAAAAAGC	74
Gcr1	Gcr1dir	CATTGTCTCCACATTGTAT-- GAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	75
	Gcr1inv	GTATTCCCACCAGAATCTTCATACAAT-- GTGGAGACAATGC	76
QA-1F	QA-1 Fdir	GCTGATAGCCTAACGTTCAT-- GTTCTAACCCTACTTGACAGC	77
	QA-1 Finv	GTCAAGTAGGGGTTAGAACATGAACGT-- TAGGCTATCAGCAG	78
736-741	d736-41dir	GGAATACTGCTGATAGCTTCATGAT-- CAAAATTTAACTGTTC	79
	d736-41 inv	GTTAAATTTTGATCATGAAGCTAT-- CAGCAGTATTCCCACC	80
737-738	d737-38dir	GGAATACTGCTGATAGCCACGTTCATG-- ATCAAAATTTAACTG	81
	d737-38inv	GTTAAATTTTGATCATGAACGTG-- GCTATCAGCAGTATTCC	82

b) Transformación de *Pichia pastoris* y caracterización de clones

Los plásmidos contruidos, como se ha descrito anteriormente, se prepararon y se transformaron en *Pichia pastoris* como se describe el ejemplo 1.

Resultados y Exposición

Se observó un fuerte efecto sobre el nivel de expresión con las mutaciones más cortas del ejemplo 2 como ya se ha descrito para las delecciones más largas del ejemplo 1, en el que todas las mutaciones tienen un efecto significativo positivo o negativo sobre la actividad promotora. Las delecciones cortas de sitios de unión a factores de transcripción específicos tienen fuertes efectos sobre la actividad promotora y proporcionan una información más precisa sobre las propiedades reguladoras de los sitios reguladores individuales (por ejemplo sitios de unión a factores de transcripción). Gcr1 es de especial interés ya que su sitio de unión está incluido en la delección Δ6. La secuenciación de la región promotora de un mutante de delección pAOXΔ6 y un producto PCR de colonia del ADN genómico de clones de *Pichia pastoris* reveló una delección adicional en la región promotora (delección de los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) de la SEC ID N° 1). Debido al hecho de que esta variante promotora conduce a una actividad promotora aumentada, dando como resultado, en consecuencia, una mayor tasa de expresión, en condiciones de desrepresión, la mutación adicional puede introducirse en un promotor, de acuerdo con la presente invención, para aumentar la expresión de proteínas en estas condiciones.

La actividad promotora de clones QA-1F con una delección adicional (delección de nucleótidos 736 a 741 (-218 a -213) de la SEC ID N° 1) es significativamente diferente en comparación con el promotor AQA-1F sin esta delección adicional: La actividad cambia de ~ 30% (desrepresión) y ~ 100% (inducción) de la actividad de tipo silvestre (AOX1ΔQA-1F, véase la tabla 15) a ~ 140% y ~ 70%, respectivamente (AOX1ΔQA-1F_{zus}, véase la tabla 15). La delección adicional de estos 6 nucleótidos parece tener una notable influencia sobre la actividad promotora. Por lo tanto, se introdujo una nueva variante promotora que lleva esta mutación (Δ 736-741) mediante el protocolo de mutagénesis

dirigida, como se ha descrito anteriormente. Ambas mutaciones, que aparecieron dos veces accidental e independientemente en esa región, dieron como resultado un aumento de la actividad promotora en condiciones de desrepresión. Es notable que exista un aumento en la actividad promotora aunque exista una segunda mutación y más probablemente de influencia negativa en ambas construcciones.

Se generó una combinación de $\Delta 2$ y $\Delta 6$ ($\Delta 2\Delta 6$) similar a las delecciones individuales por PCR de expresión solapante. En la tabla 17 se muestra claramente que una delección de ambos fragmentos da como resultado una fuerte disminución de la actividad promotora en condiciones de desrepresión así como en condiciones de inducción. Dado que en esta construcción no existe una delección adicional de TA, en comparación con la construcción $\Delta 6^*$, como también se ha mencionado anteriormente, esto resulta compatible con la hipótesis de que la mutación adicional producida accidentalmente ($\Delta 737$ -38) es responsable del aumento de la actividad promotora después de la privación de carbono.

Diversas delecciones dan como resultado una disminución notable de la actividad promotora (por ejemplo Hsf, pero también Hap1 y Hap2345_1). Estos supuestos sitios de unión son brillantes dianas para una duplicación de secuencias que deben dar como resultado un aumento de la actividad promotora.

De manera interesante, en 2 de 4 clones de la variante $\Delta 736$ -741 generados por mutagénesis dirigida, se observó una nueva delección de 9 nucleótidos (TTGGTATTG) en la posición 552 a 560 (-402 a -394). El efecto de las delecciones se observó en regiones distintas pero también se observó en construcciones AHsf_2. Se esperaba que dicho efecto se debiera a una homología de secuencia local. Por lo tanto dichas regiones adicionalmente delecionadas ($\Delta 552$ -560, $\Delta 737$ -38 y $\Delta 736$ -41) y las secuencias en estrecha proximidad (5pb aguas arriba y abajo) también son supuestos sitios de unión a factores de transcripción y por lo tanto dianas sumamente interesantes para realizar delecciones y duplicados. La variante de delección $\Delta 736$ -41 da como resultado una reducción mejorada del nivel de expresión en condiciones de inducción con metanol.

Cepas multicopia

En la mayoría de los casos, la generación de cepas multicopia da como resultado cepas de superexpresión de GFP-Zeo. En muchos casos estas cepas tienen mayores niveles de expresión que las cepas $d6^*F10$, principalmente en condiciones de inducción con metanol. La generación de cepas multicopia puede conseguirse con diversas construcciones, especialmente con la construcción $\Delta 6^*$, las construcciones de doble delección $d2d6$, que incluyen las delecciones $\Delta 1$, $\Delta 2$ y $\Delta 6^*$ así como, por ejemplo, Gcr1, Rap1, abaA, Hap2345_1, pero también, por ejemplo, QA-1F, Adr1, Hsf_2_Mat1MC y Hsf_2_Hap2345_1 (véase la figura 7). En estas cepas se observó una mayor tasa de expresión en condiciones de inducción en comparación con la cepa $d6^*F10$. En cambio, la cepa $d6^*F10$ puede producir más GFP-Zeo que cualquier otra cepa generada hasta ahora conocida en condiciones de desrepresión. La transformación repetida de construcciones $\Delta 6^*$ en *Pichia pastoris* da como resultado un elevado número de cepas multicopia con actividad comparable a la de la cepa $d6^*F10$, especialmente en condiciones de desrepresión (figura 8).

Usando construcciones promotoras de tipo silvestre, se observó una frecuencia mucho más baja de cepas multicopia (por ejemplo, la cepa E2) que usando variantes promotoras. Aunque se analizaron de 2-4 veces más transformantes, el nivel de expresión de los mejores transformantes de E2 es solamente el doble de elevado que las copias de transformantes unicopia. Concluyendo, la transformación de variantes promotoras dan como resultado una mayor frecuencia de cepas multicopia y estas cepas múltiples son más productivas que las cepas multicopia promotoras de tipo silvestre.

Ejemplo 3

Proteínas indicadoras alternativas

Para ensayar la viabilidad de todos los resultados de GFP-Zeo para otras proteínas básicamente bien expresadas e industrialmente relevantes (por ejemplo enzimas) se clonaron algunas variantes promotoras delante de dichas enzimas indicadoras (por ejemplo, PaHNL5 α y HRP).

Clonación

Se clonaron variantes promotoras dentro de los vectores pPICZ $\alpha\beta$ -HRP-WT [35] y pGAPZ A-PaHNL5 α . Para el intercambio del promotor en pPICZ $\alpha\beta$ -HRP-WT, se insertó un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' del promotor por mutagénesis dirigida (100 ng del vector como molde, cebador PICZdir NdeI y PICZinv NdeI - véase la tabla 18). El vector resultante se denominó pPICZ $\alpha\beta$ -NdeI-HRP-WT.

TABLA 18

Cebador para mutagénesis dirigida para la introducción de un sitio de restricción NdeI en pPICZαB-HRP-WT y para intercambio del promotor

Nombre	Secuencia (5'→3')	Sec ID N°.
<i>NdeI</i> PICZdir	GAGATCAGATCTAACATATGCCAAAGACGAAAG-GTTG	83
<i>NdeI</i> PICZinv	CAACCTTTCGTCTTTGGCATATGTTAGATCTG-ATCTC	84
AOX1NDE1	AAACATATGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGG	85
AOX1inv	TGGTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTG	86

Para el clon de expresión pGAPZ A-PaHNL5α se clonó en primer lugar el gen *PaHNL5α* a partir de un vector pHIL-D2 (Glieder, A., *et al.* Angew. Chemie Int. Ed. 2003) en un vector pGAPZ A, dando como resultado un plásmido pGAPZA-PaHNL5α. La clonación de variantes promotoras en pGAPZ A-PaHNL5α podría realizarse directamente después de la digestión de plásmidos pGAPZ A-PaHNL5α y pAOXΔ con *EcoRI/BglIII*. Para un intercambio en pPICZαB-*NdeI*-HRP-WT las variantes promotoras se amplificaron por PCR usando cebadores AOX1NDE1 y AOX1inv (véase la tabla 18, 10 ng de pAOXΔ, 10 pmol de cebadores AOX1NDE1 y AOX1inv, 200 μM de cada dNTP, 0,6 u de polimerasa Phusion™ polimerasa en condiciones de tampón apropiadas y un volumen total de 50 μl). Los productos de PCR y el plásmido pPICZαB-*NdeI*-HRP-WT se clonaron empleando sitios de restricción *NdeI/HindIII*.

Transformación, cultivo y ensayos enzimáticos

Para la transformación de *Pichia pastoris* todos los vectores HRP se linealizaron por *NdeI* y todos los plásmidos *PaHNL5α* por *BglIII*. La transformación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1. El cultivo de cepas de *P. pastoris* también se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1, solo con algunas excepciones. La cantidad de BDM inicial (1%) se aumentó a 350 μl y después de 60 horas se tomaron 100 μl de cultivo para centrifugación (4000 rpm, 4°C, 10 min). La inducción con metanol se realizó exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1.

Para el ensayo de HNL, se tomaron 50 μl (desrepresión) o 10 μl (inducción) de sobrenadante de centrifugación y para el ensayo de HRP se tomaron 15 μl, para ambas condiciones.

Ensayo de HRP (de acuerdo con [35])

Se añadieron 15 μl de sobrenadante a 150 μl de ABTS 1 mM/H₂O₂ 2,9 mM en tampón NaOAc 50 mM, pH 4,5 en placas de microtitulación PS. La absorción prosiguió durante 5 minutos a 405 nm en un lector de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Ensayo de HNL (de acuerdo con [36])

Se añadieron 50 μl o 10 μl de sobrenadante a 100 o 140 μl de tampón citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0 en una placa de microtitulación UV-Star. La reacción comenzó añadiendo 50 μl de solución de mandelonitrilo 0,06 M (en tampón citrato-fosfato 0,003 M, pH 3,5) y prosiguió durante 5 minutos a 280 nm en un lector de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Resultados y exposición

Los resultados usando las proteínas indicadoras alternativas *PaHNL5α* y HRP muestran claramente la posibilidad de transferencia de la actividad del promotor usando GFP-Zeo (Tabla 17).

Debido a la menor sensibilidad del ensayo HRP el nivel de expresión en condiciones de desrepresión estuvo por debajo del límite de detección. Por lo tanto la expresión de HRP no pudo determinarse en condiciones de desrepresión.

TABLA 17

Actividad del promotor de diversas variantes del promotor de AOX1 con enzimas indicadoras alternativas (entre paréntesis se indica la actividad relativa en comparación con el promotor de tipo silvestre en las mismas condiciones (desrepresión e inducción, respectivamente))

Promotor	GFP-Zeo		PaHNL5 α		HRP	
	Desrepres.	Metanol	Desrepres [mU/min]	Metanol [mU/min]	Desrepres [mU/min]	Metanol [mU/min]
P(AOX1)	27,3 (100%)	987 (100%)	2,58 (100%)	69,5 (100%)	n,d,	20,3 (100%)
P(AOX1) Δ 1	29,5 (108%)	1188 (120%)	2,37 (92%)	100 (144%)	n,d,	26,9 (132%)
P(AOX1) Δ 2	43,0 (157%)	399 (40%)	n,d,	91,7 (132%)	n,d,	9,6 (47%)
P(AOX1) Δ 6*	89,9 (329%)	422 (42%)	8,65 (335%)	51,7 (74%)	n,d,	17,5 (86%)
P(AOX1) Δ 2 Δ 6	9,9 (36%)	336 (34%)	1,29 (50%)	37,5 (54%)	n,d,	9,9 (49%)
n,d, no detectable						

Para transferir la selección multicopia a los sistemas indicadores alternativos, se clonaron variantes del promotor de AOX1 en los plásmidos HRP y PaHNL5 α apropiados delante del gen de resistencia a Zeocina sustituyendo por lo tanto el promotor TEF1.

Ejemplo 4

Proteína indicadora alternativa GFP

Para ensayar las variantes promotoras con GFP, las variantes promotoras descritas en los ejemplos 1 y 2 se clonaron delante de un gen del ciclo-3 GFP.

Clonación

Los sitios de restricción internos BamHI y XhoI en el ciclo-3 GFP en el vector pAOX se delecionaron por mutagénesis dirigida empleando cebadores Bam-del-d y Xho-del-i (Tabla 19) y 100 ng del vector como molde. El fragmento de GFP se amplificó por PCR a partir del plásmido resultante (10 ng) empleando cebadores GFP-Zeo dir (Sec. ID N° 4, Tabla 7, 10 pmol) y wtGFP-XhoI-i (Tabla 19, 10 pmol) y polimerasa PhusionTM en condiciones apropiadas. El producto resultante de la PCR pudo clonarse dentro del vector pPICZ B empleando cortes de restricción con EcoRI/XhoI y ligamiento usando ADN ligasa de T4. El plásmido resultante se denominó pPICZ-GFP.

La clonación de todas las variantes promotoras en pPICZ-GFP pudo realizarse directamente después de la digestión con BglIII/EcoRI de los plásmidos pPICZ-GFP y plásmidos pAOX.

TABLA 19

Cebadores para mutagénesis dirigida del ciclo-3-GFP en el vector pAOX y amplificación del fragmento de GFP del mismo

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Sec. ID. N°
Bam-del-d	cgccacaacattgaagatggttccgttcaactagcagac- cattatc ggaaacattctcggacacaaact-	87
Xho-del-d	tgagtacaactataactcacacaatg	88
wtGFP-XhoI-i	atctcgagttacttgtacaattcatccatgccatgt- gtaatccc	89

Transformación, cultivo y detección de GFP

Para la transformación de *Pichia pastoris* todos los plásmidos se linealizaron por *Bgl*II. La transformación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1. Después de la transformación y de una fase de regeneración de unas 2 horas las células se sembraron en placa sobre placas de agar YPD-Zeo que contenía 100 µg/ml de Zeocina.

El cultivo de *Pichia pastoris*, la inducción con metanol y la medición de la fluorescencia de GFP se realizó exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1.

Resultados y exposición

Usando GFP como sistema indicador, de nuevo los resultados muestran la capacidad de transferencia de la actividad promotora detectada usando GFP-Zeo (Tabla 20).

Cepas multicopia

Como se ha descrito el ejemplo 1 y 2, la aparición de cepas multicopia usando Zeocina como marcador de selección es muy común. La frecuencia de cepas multicopia podría aumentarse enormemente aumentando la concentración de Zeocina, en las placas de selección, a 500 y 1000 µg/ml, respectivamente.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 356 127 T3

TABLA 20

Actividad relativa del promotor de diversas variantes del promotor de AOX1 con GFP y GFP-Zeo como gen indicador en comparación con el promotor de tipo silvestre en las mismas condiciones (desrepresión e inducción, respectivamente)

Variante del Promotor	GFP		GFP-Zeo	
	Cepa Nº.	URF Metanol	Cepa Nº	URF Metanol
WT	E1	100 %	D2	100 %
Δ Hap1	C9	89 %	A2	84 %
Δ 1	4E6	79 %	A9	134 %
Δ 1-3	8-F12	75 %	D5	67 %
Δ 2	G12	37 %	F2	40 %
Δ Rap1	D6	27 %	B9	34 %
Δ 3	H3	26 %	H2	70 %
Δ Adr1	A9	50 %	A2	56 %
Δ 4	C7	66 %	H9	71 %
Δ 5	38E6	28 %	D4	31 %
Δ Mat1MC	6C2	31 %	F6	32 %
Δ 6	37F5	79 %	H3	91 %
Δ 6*	E11	23 %	A5	40 %
Δ Gcr1	A9	60 %	A2	55 %
Δ 7	D12	38 %	A7	25 %
Δ QA-1 F	7A3	61 %	E2	61 %
Δ QA-1 Fzus	7A6	15 %	H7	25 %
Δ 8	E1	11 %	H1	17 %
Δ 9	3E5	23 %	A12	61 %
Δ 2A6	4B10	22 %	F3	21 %
Δ 736-41	5A7	8.8 %	C6	6 %
Δ 737-38	1G11	5.0 %	A3	8%
Cepas multicopia				
Δ 1-3	8B10	400 %		
Δ 6	37A3	650 %		

Ejemplo 5

Series suficientes usando GFP

Para ensayar pequeñas partes del promotor de AOX1 en un sistema libre de casi todos los sitios de unión a factores de transcripción, el promotor de AOX1 se cortó en algunos pares de bases delante de la caja TATA en las posiciones -176 y -194 dando como resultado elementos promotores basales AOX176 y AOX194 (Tabla 21). Para permitir la clonación posterior de elementos promotores delante de los fragmentos promotores basales así como la clonación de promotor basal se insertó un sitio de restricción *Bsp*TI y *Eco*RI en el extremo 5' y 3', respectivamente.

TABLA 21

*Secuencia de elementos basales del promotor de AOX1, AOX176 y AOX194 y fragmentos promotores 737 y 201-214 que se añadirán delante de variantes promotoras basales. Los sitios de restricción *Bsp*TI y *Eco*RI se indican subrayados*

Nombre	Secuencia (5'→3')	Sec. ID N°.
AOX176	<u>CTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT</u> - GTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAAC- TGAGAAGATCAAAAAACAACATAATTATTGAAAGAATTC	90
AOX194	<u>CTTAAGTGTCTAACCCTACTTGACAGCAATATA</u> - TAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCT- TAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAAC- TGAGAAGATCAAAAAACAACATAATTATTGAAAGAATTC	91
737	TAGCCTAACGTT	92
201-214	CATGATCAAAATTT	93

Clonación

Se amplificaron elementos de AOX1 basales a partir de pAOX (10 ng) usando cebadores AOX1basalinv (Tabla 21, 10 pmol) y AOXbasaldir (10 pmol, AOX194) y AOX176dir (10 pmol, AOX176), respectivamente. La PCR se realizó usando polimerasa Phusion™ (0,6 u) en condiciones apropiadas en un volumen total de 50 µl.

La variante del promotor AOX176-737 se amplificó por PCR usando cebadores AOX1basalinv y 737-38AOX176 como se ha descrito anteriormente. La variante del promotor AOX176-201-214 se amplificó por PCR usando cebadores AOX1basalinv y 201-214AOX176 como se ha descrito anteriormente.

Los productos resultantes de la PCR pudieron clonarse dentro del vector pPICZ-GFP empleando cortes de restricción con *Bgl*II/*Eco*RI y ligamiento usando ADN ligasa de T4 sustituyendo, por tanto, el promotor de AOX1 de tipo silvestre.

*Bgl*II *Bsp*TI *Eco*RI

AGATCTCGAC TTAAGCAATC GTCTTACTTT CTAACITTTT TTACCTTTTA CATTTCAGCA ATATATATAT ATATTTCAAG GATATACCGA ATTC

TCTAGAGCTG AATTCGTTAG CAGAATGAAA GATTGAAAAG AATGGAAAAT GTAAAGTCGT TATATATATA TATAAAGTTC CTATATGGCT TAAG

ES 2 356 127 T3

Los 4 oligonucleótidos Leu2basal1d, Leu2basal2d, Leu2basal1i y Leu2basal2i (25 pmol cada uno) se mezclaron en un volumen total de 20 μ l, se calentó a 95°C durante 2 minutos y se enfrió a temperatura ambiente lentamente. Se realizó el ligamiento de 3 μ l de la mezcla con 159 ng de un fragmento pPICZ-GFP con *Bgl*II/*Eco*RI durante 6 horas a 16°C. Después de la transformación en *E. coli* el vector resultante se denominó pLeu2basal-GFP.

La variante promotora Leu2-737 se amplificó por PCR usando cebadores Leu2basalinv y 737-38Leu2 y pLeu2basal-GFP como molde, como se ha descrito anteriormente. El producto resultante de la PCR pudo clonarse en el vector pPICZ-GFP empleando cortes de restricción con *Bgl*II/*Eco*RI y ligamiento usando ADN ligasa de T4 sustituyendo, por tanto, el promotor de *AOX1* de tipo silvestre. El plásmido resultante se denominó pLeu2-GFP-737.

TABLA 22

Cebadores para la generación de elementos promotores basales y construcciones suficientes

Nombre	Secuencia (5'→3')	Sec. ID N°.
AOX1basalinv	TTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTGTTTTTG	94
AOX176dir	TTAGATCTCGACTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAG- GAAG	95
AOX1basaldir n	TTAGATCTCGACTTAAGTGTCTAACCCCTACTTGACAG	96
737-38AOX176	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGGACAGCAATATA- TAAACAGAAGGAAG	97
201-214AOX176	AAAGATCTCATGATCAAAATTTCTTAAGGACAGCAATA- TATAAACAGAAGGAAG	98
LEU2basal1dir	GATCTCGACTTAAGCAATCGTCT- TACTTTCTAACTTTTCTTACCTTTTACATTTTCAG	99
LEU2basal2dir	CAATATATATATATATTTCAAGGATATACCG	100
LEU2basal1inv	AATTTCGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCT- GAAATGTAAAAG	101
LEU2basal2inv	GTAAGAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTTAAGTCGA	102
LEU2basalinv	GGTTGAATTCGGTATATCCTTG	103
737-38Leu2	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGCAATCGTCT- TACTTTCTAAC	104

Transformación, cultivo y detección de GFP

Para la transformación de *Pichia pastoris* todos los plásmidos se linealizaron por *Bam*HI. La transformación se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1. Después de la transformación y de una fase de regeneración de 2 h, las células se sembraron en placa en placas de agar YPD-Zeo que contenían 100 μ g/ml de Zeocina.

El cultivo de *Pichia pastoris*, la inducción de metanol y las mediciones de fluorescencia de GFP se realizaron exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1.

Resultados y exposición

Este experimento demuestra que la adicción de pequeños elementos, identificados en los ejemplos 1 y 2, podría usarse para aumentar la fuerza promotora de elementos promotores basales derivados del promotor de *AOX1* o derivados del promotor de LEU2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepas multicopia

La aparición y la frecuencia de cepas multicopia observadas después de la transformación es exactamente la misma a la descrita en el Ejemplo 4. El sitio de linearización diferente dentro del plásmido no ejerció ninguna influencia sobre la generación de cepas multicopia.

TABLA 23

Actividad promotora de elementos promotores basales sin y después de la adicción de pequeños fragmentos del promotor de AOX1 que supuestamente actúan como sitios de unión a reguladores. Como proteína indicadora se usó GFP. Se muestran cepas unicopia así como cepas multicopia

	Unicopia		Multicopia	
	Desrepresión	Metanol	Desrepresión	Metanol
	URF	URF	URF	URF
pAOX176-GFP	n.d.	22,1 ± 0,2	-	-
pAOX194-GFP	n.d.	16,9 ± 2,9	-	-
pAOX176-GFP-737	n.d.	21,2 ± 1,1	59 ± 6	265 ± 38
pAOX176-GFP-201-214	69,6 ± 6,0	44,9 ± 4,8	-	-
pLeu2basal-GFP	n.d.	11,3 ± 3,6	-	-
pLeu2-GFP-737	n.d.	19,2 ± 1,9	55 ± 5	138 ± 11

Referencias

- [1] Nakagawa, T., et al. (1999) *Yeast* 15(12), 1223-30.
- [2] Koutz, P., et al. (1989) *Yeast* 5(3), 167-77.
- [3] Ohi, H., et al. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243(5), 489-99.
- [4] Cregg, J. M., et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9(3), 1316-23.
- [5] Nakagawa, T., et al. (2002) *Yeast* 19(12), 1067-73.
- [6] Sakai, Y., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(22), 5885-5890.
- [7] Genu, V., et al. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270(11), 2467-2475.
- [8] Goedecke, S., et al. (1994) *Gene* 139(1), 35-42.
- [9] Tschopp, J. F., et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(9), 3859-76.
- [10] Parpinello, G., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(11), 2958-67.
- [11] Alamae, T. et al. (1994) *Yeast* 10(11), 1459-66.
- [12] Inan, M. et al. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* 92(6), 585-589.
- [13] Sreekrishna, K., et al. (1997) *Gene* 190(1), 55-62.
- [14] Romanos, M., et al. (1998) *Methods Mol. Biol.* 103(55-72).
- [15] Quandt, K., et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23(23), 4878-84.
- [16] Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 2003.
- [17] Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16(22), 10881-90.

- [18] Chenna, R., *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3497-500.
- [19] Bennett, R. P., *et al.* (1998) *BioTechniques* 24(3), 478-82.
- 5 [20] Fariñas, E. T., *et al.* (2001) *Adv. Synth. Catal.* 343(6), 601-606.
- [21] Huie, M. A. *et al.* (1996) *Yeast* 12(4), 307-17.
- [22] López, M. C., *et al.* (1998) *PNAS U. S. A.* 95(24), 14112-7.
- 10 [23] Zeng, X., *et al.* (1997) *Genetics* 147(2), 493-505.
- [24] Del Vescovo, V., *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 338(5), 877-93.
- 15 [25] Simón, M., *et al.* (1992) *Yeast* 8(4), 303-9.
- [26] Raschke, W. C., *et al.* (1996) *Gene* 177(1-2), 163-7.
- [27] Andrianopoulos, A. *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14(4), 2503-15.
- 20 [28] Kwast, K. E., *et al.* (1998) *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8) (1177-95).
- [29] Bourgarel, D., *et al.* (1999) *Mol. Microbiol.* 31(4), 1205-15.
- 25 [30] Dang, V. D., *et al.* (1996) *J. Bacteriol.* 178(7), 1842-9.
- [31] Hahn, J. S. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279(7), 5169-76.
- [32] WO 02/081650
- 30 [33] US 6,699,691
- [34] Wang, W. *et al.* (1999) *Biotechniques* 26(4), 680-2.
- 35 [35] Morawski, B., *et al.* (2000) *Protein Eng* 13(5), 377-84.
- [36] Weis, R., *et al.* (2004) *FEMS Yeast Res.* 5, 179-189.

40 Lista de secuencias

Sec ID Nº 1: Promotor de AOX1 de *Pichia pastoris*

45 ggtaccagatctaacaatccaaagacgaaagggttgaaatgaaacctttttgccatccgacatc-
cacagggtccattctcacacataagtgccaaacgcaacaggaggggatacactagcagcagac-
cgttgcaaacgcaggacctccactcctcttctcctcaacacccacttttgccatcgaaaaac-
cagcccagttattgggcttgattggagctcgctcattccaattccttctattaggctactaa-
50 caccatgactttattagcctgtctatcctggccccctggcgagggttcattgtttgtttatttc-
cgaatgcaacaagctccgcattacacccgaacatcactccagatgagggctttct-
gagtggtgggtcaaatagtttcatgttccccaaatggccaaaactgacagtttaaa-
55 cgctgtcttggaacctaatatgacaaaagcgtgatctcatccaagatgaactaagtttggtt-
cgttgaaatgctaacggccagttggtcaaaaagaaacttccaaaagtcggcatac-
cgtttggtcttggttggtattgattgacgaatgctcaaaaataatctcattaatgcttagcg-
60 cagtctctctatcgcttctgaaccccggtgcacctgtgccgaaacgcaaattggggaaacacc-
cgctttttggatgattatgcattgtctccacattgtatgcttccaagattctggtgggaa-
tactgctgatagcctaacgttcattgatcaaaatttaactgttctaaccctacttgacagcaa-
65 tatataaacagaaggaagctgccctgtcttaaaccttttttttatcatcattattagct-
tactttcataattgcgactgggtccaattgacaagcttttgattttaacgacttttaacga-
caacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaagaattcaacc

REIVINDICACIONES

1. Un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* del promotor de AOX1 de *Pichia pastoris* de tipo silvestre (SEC ID. N°: 1) que comprende al menos una mutación dentro de los nucleótidos 170 a 235 (-784 a -719) de la Sec. ID N°: 1 para una expresión elevada en condiciones inducidas por metanol.
2. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el promotor comprende adicionalmente una mutación de los nucleótidos 694 a 723 (-260 a - 231) y/o de los nucleótidos 729 a 763 (-225 a -191) de la Sec ID N°1 y/o de un sitio de unión a factores de transcripción (TFBS) y/o al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 170 a 191 (-784 a -763), los nucleótidos 192 a 213 (-762 a -741), los nucleótidos 192 a 210 (-762 a -744), los nucleótidos 207 a 209 (-747 a -745), los nucleótidos 214 a 235 (-740 a -719), los nucleótidos 304 a 350 (-650 a -604), los nucleótidos 364 a 393 (-590 a -561), los nucleótidos 434 a 508 (-520 a -446), los nucleótidos 509 a 551 (-445 a -403), los nucleótidos 552 a 560 (-402 a -394), los nucleótidos 585 a 617 (-369 a -337), los nucleótidos 621 a 660 (-333 a -294), los nucleótidos 625 a 683 (-329 a -271), los nucleótidos 736 a 741 (-218 a -213), los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216), los nucleótidos 726 a 755 (-228 a -199), los nucleótidos 784 a 800 (-170 a -154) o los nucleótidos 823 a 861 (-131 a -93).
3. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por que la mutación es una delección, una sustitución, una inserción o una inversión.
4. El promotor de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado** por que el sitio de unión a factores de transcripción (TFBS) se selecciona del grupo que consiste en Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC, Gcr1 y QA-1F, en el que el sitio de unión a factores de transcripción (TFBS) Hap1 comprende preferiblemente los nucleótidos 54 a 58 de la Sec ID N°. 1, Hsf los nucleótidos 142 a 149 y 517 a 524 de la Sec ID N°.1, Hap234 los nucleótidos 196 a 200, 206 a 210 y 668 a 672 de la Sec ID N°.1, abaA los nucleótidos 219 a 224 de la Sec ID N°. 1, Stre los nucleótidos 281 a 285 de la Sec ID N°. 1, Rap1 los nucleótidos 335 a 339 de la Sec ID N°. 1, Adr1 los nucleótidos 371 a 377 de la Sec ID N°. 1, Mat1MC los nucleótidos 683 a 687 de la Sec ID N°. 1, Gcr1 los nucleótidos 702 a 706 de la Sec ID N°. 1 y QA-1F los nucleótidos 747 a 761 de la Sec ID N°. 1.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína (péptido) o un ácido nucleico funcional, **caracterizado** por que dicho promotor y dicho ácido nucleico están unidos operativamente entre sí formando un casete de expresión unicopia o multicopia.
6. Un vector que comprende un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una célula que comprende al menos un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, al menos un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** por que dicha célula es una célula eucariota, en particular una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.
9. Un kit para la expresión de una proteína seleccionada que comprende
 - i) un vector de acuerdo con la reivindicación 6, y
 - ii) una célula que puede expresar dicha proteína bajo el control de un promotor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Un kit de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** por que dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, preferiblemente seleccionada en el grupo que consiste de *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.
11. Un método para la expresión de una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcionales recombinantes en una célula que comprende las siguientes etapas:
 - proporcionar una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende un promotor de AOX1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional, estando dicho promotor unido operativamente a dicho ácido nucleico,
 - transformar dicha célula con dicho vector o dicha molécula de ácido nucleico,

- cultivar la célula transformada en un medio de cultivo adecuado,
- opcionalmente inducir la expresión de dicha proteína, péptido o ácido nucleico funcional y
- aislar dicha proteína, péptido o ácido nucleico funcional expresados.

5

12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** por que dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, en particular a una célula *Pichia pastoris*.

10

13. El uso de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, de un vector de acuerdo con la reivindicación 6, o de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para la expresión de una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional.

15

14. Un método para el aislamiento de clones de superexpresión que comprende las etapas:

20

a) introducir una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor mutante de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína (péptido) o un ácido nucleico funcional y un gen de resistencia a un marcador, en el que dicho promotor y dicho ácido nucleico están unidos operativamente entre sí formando un casete de expresión unicopia o multicopia o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico en una célula,

25

b) transferir la célula de la etapa a) a un medio que comprende un marcador selectivo apropiado, una fuente de carbono no represora y metanol para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de inducción

30

c) incubar la célula de la etapa b) en dicho medio,

d) aislar una colonia de la célula obtenida en la etapa c) y

e) detectar clones de superexpresión determinando la tasa de expresión de dicha célula.

35

15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** por que el marcador selectivo es un antibiótico, preferiblemente zeocina o geneticina.

16. Método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, **caracterizado** por que el marcador selectivo es zeocina y el gen de resistencia al marcador es el gen sh ble.

40

17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 al 16, **caracterizado** por que la célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Toruplosis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.

45

18. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 al 17, **caracterizado** por que la fuente de carbono no represora se selecciona del grupo que consiste en alanina, manitol, sorbitol, trehalosa, lactosa y combinaciones de los mismos.

19. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 al 18, **caracterizado** por que la molécula ácido nucleico o el vector se introduce en la célula por transformación, preferiblemente por electroporación o transformación química, o por fusión de protoplastos o por bombardeo de partículas.

55

60

65

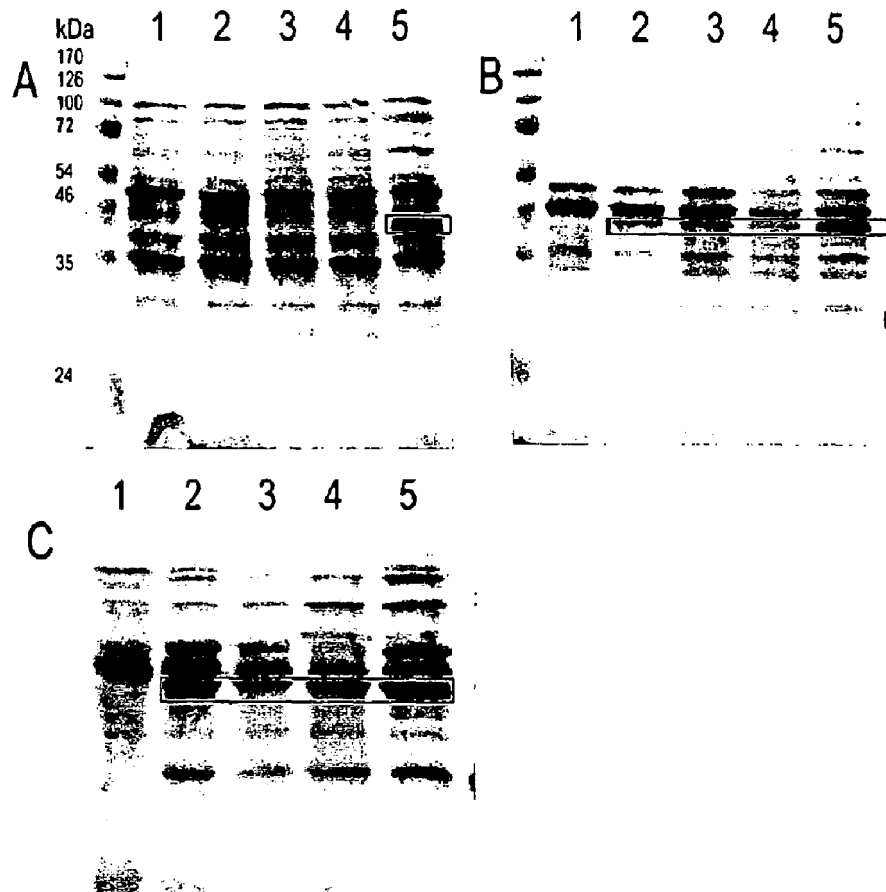


Fig. 1

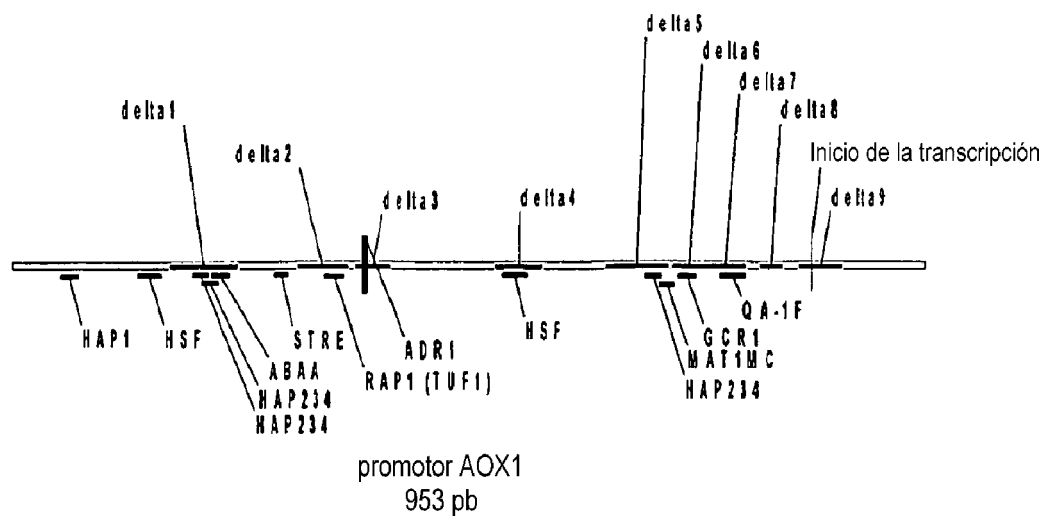


Fig. 2

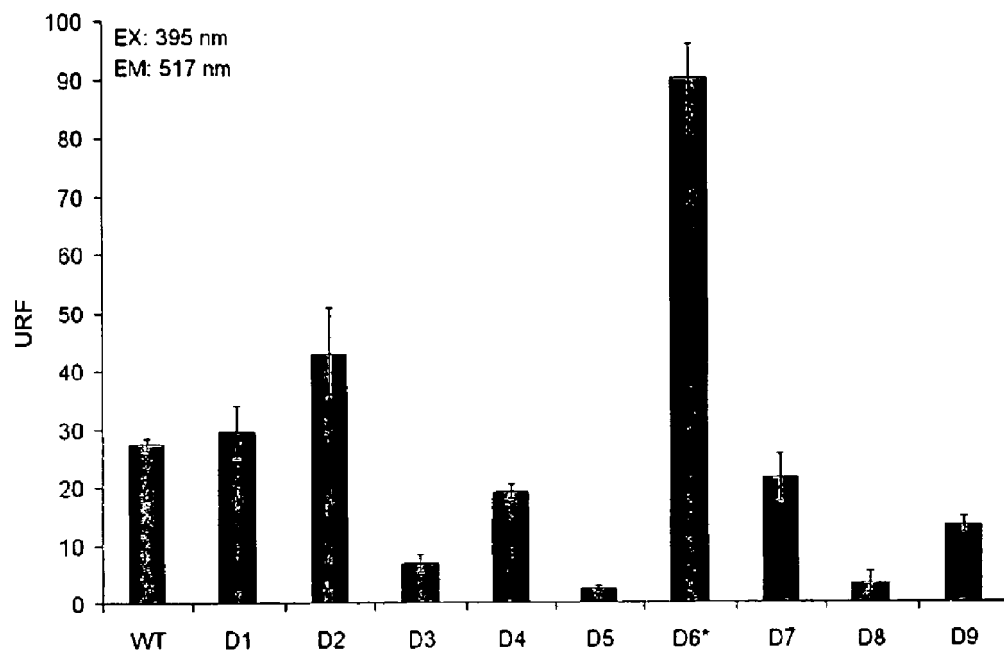


Fig. 3

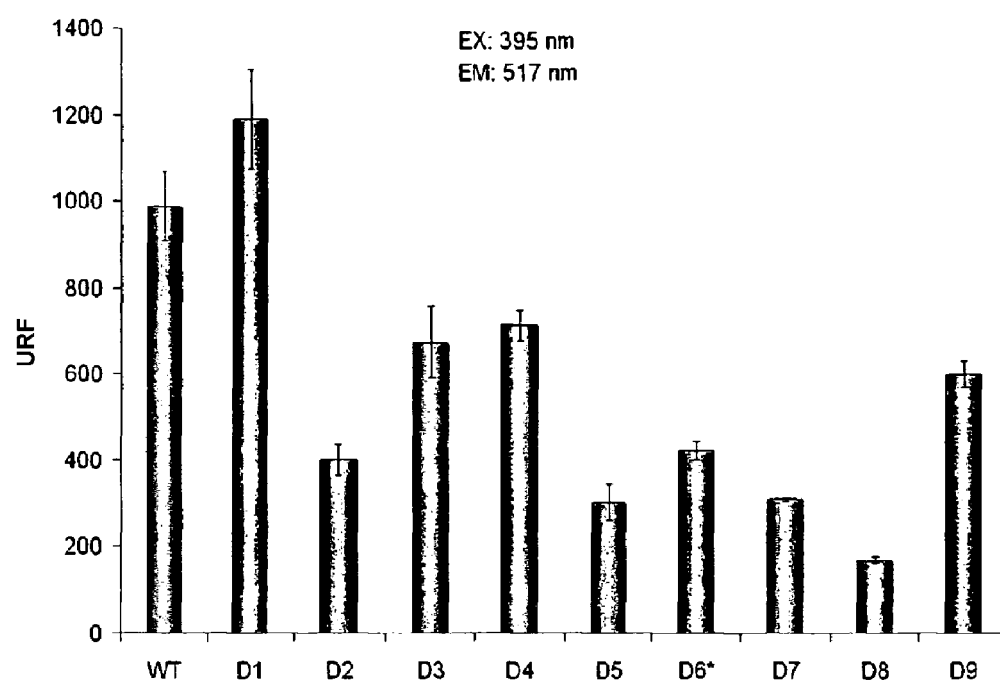


Fig. 4

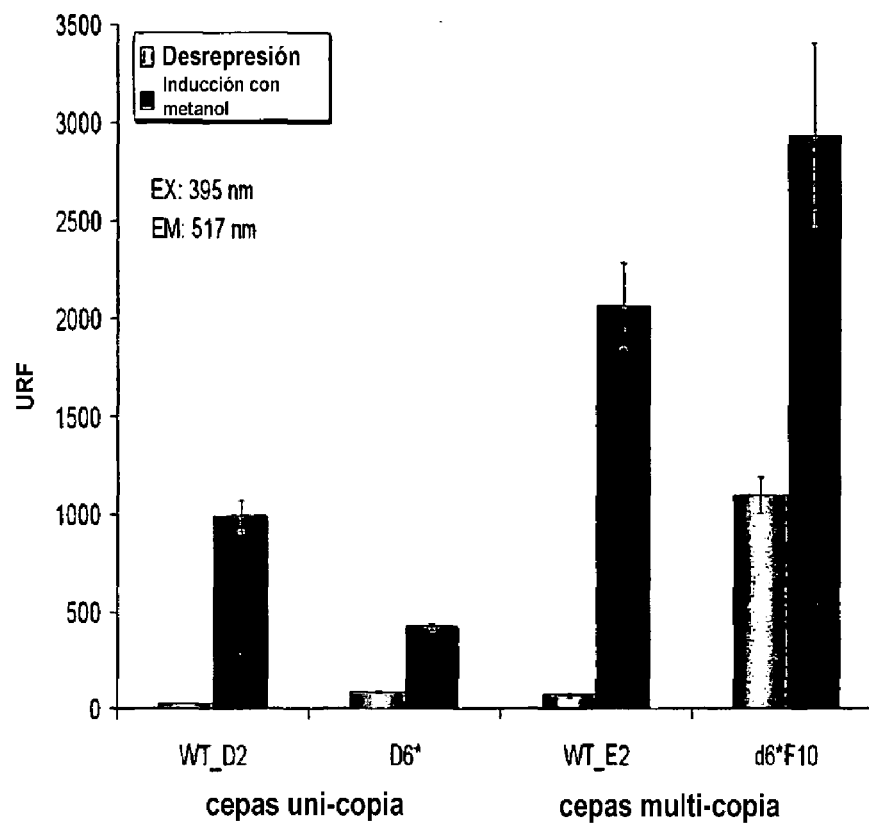


Fig. 5

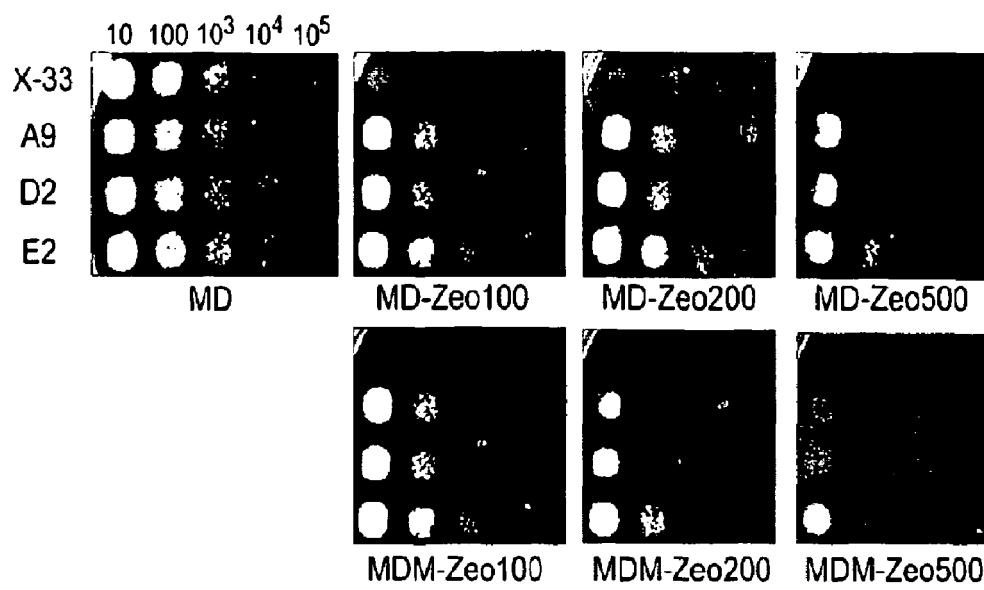


Fig. 6

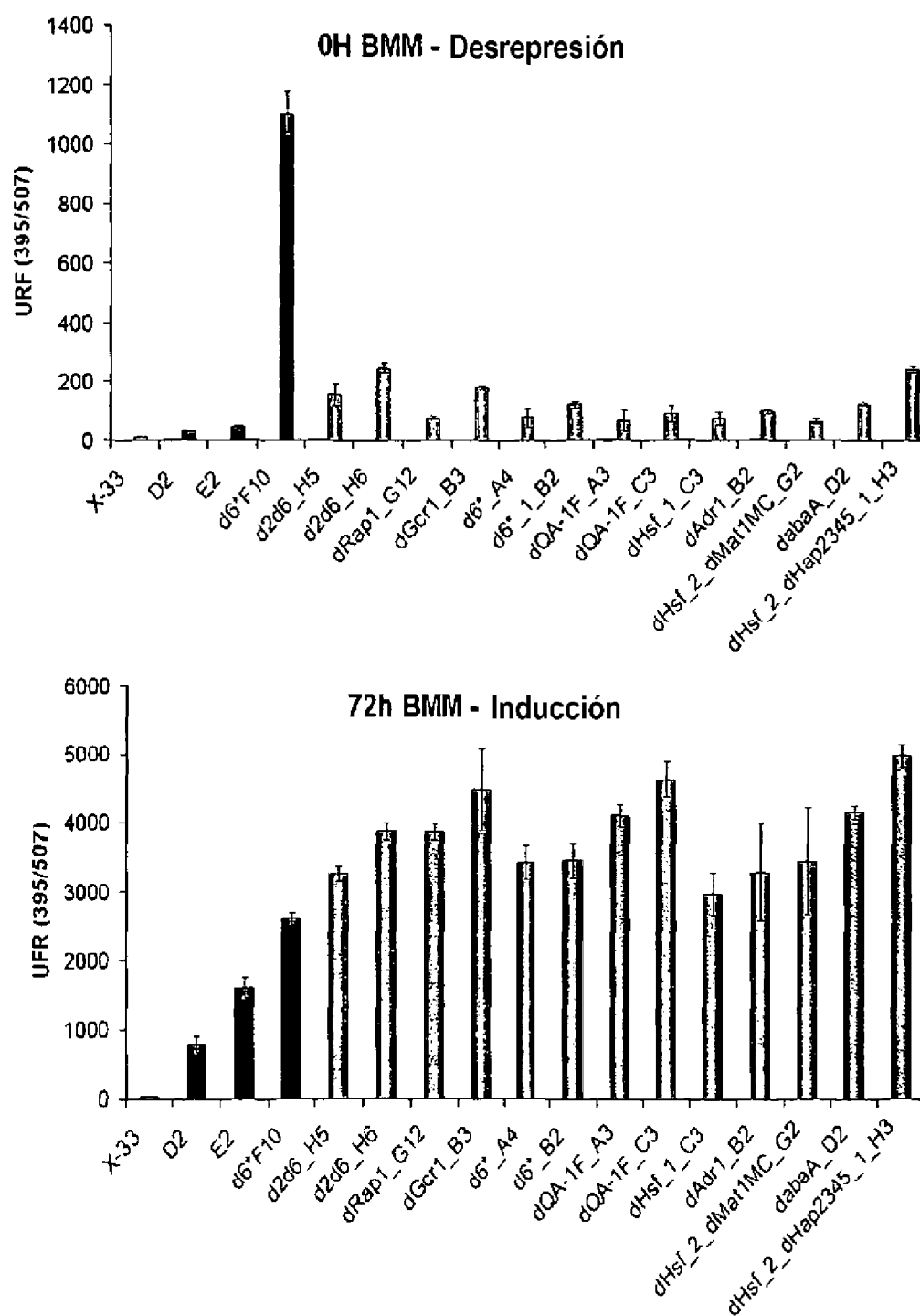


Fig. 7

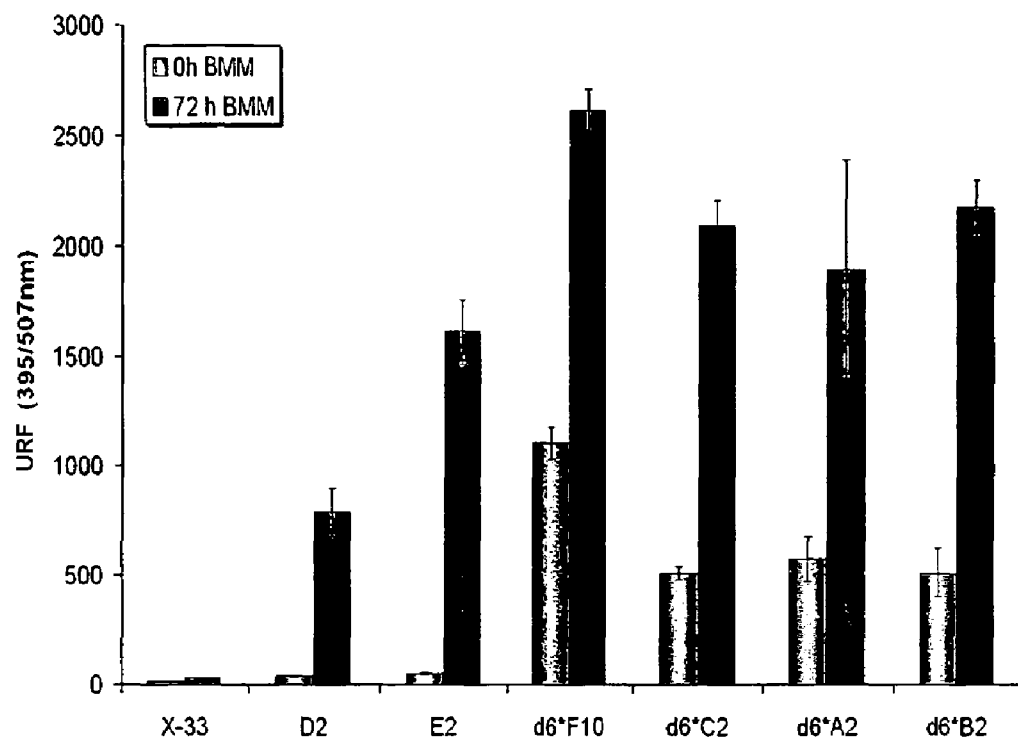


Fig. 8