



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 086**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10155180 .2**

96 Fecha de presentación : **23.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2199389**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Promotores AOX1 mutantes.**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

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**

ES 2 358 086 T3

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

DESCRIPCIÓN

Promotores AOX1 mutantes.

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

10 *S. cerevisiae* ha dominado (y todavía domina) el uso científico y biotecnológico como modelo de organismo y sistema de producción eucariótico. En el último siglo, ha aumentado sumamente el atractivo de otra levadura: la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Por su atributo para reproducirse solamente por medio de fisión *S. pombe* adquirió una atención excepcional como organismo modelo y hoy en día es la especie de levadura más intensamente estudiada en términos de genética molecular y biología celular, junto con *S. cerevisiae*. Entre las más de 700 especies de levadura diferentes conocidas hasta la fecha, las dos levaduras mencionadas antes pueden proporcionar solamente un conjunto limitado de atributos interesantes para aplicaciones tecnológicas y científicas. Desde los años 70 u 80 se han investigado más y más especies de levadura con características excepcionales para la biotecnología y la investigación. Estas levaduras denominadas no convencionales (NCY) o levaduras no *Saccharomyces* (en este caso el término *Saccharomyces* incluye la levadura *Schizosaccharomyces pombe*) se desarrollan por varias razones: poseen importancia médica como *Candida albicans* o relevancia tecnológica como *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis* que tienen la capacidad de crecer sobre sustratos concretos (p. ej. n-alcanos, lactosa). Por ejemplo el patógeno fúngico humano más común *C. albicans* se estudia extensamente para revelar la naturaleza de los factores de virulencia implicados en la patogénesis, convirtiéndose por lo tanto en el organismo modelo para las levaduras patogénicas. Otro grupo bien establecido de NCY son las levaduras metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) que son superiores a *S. cerevisiae* en términos de producción de proteína recombinante y estudios de biogénesis de peroxisomas. Estos son solamente los miembros más prominentes de las levaduras no convencionales que tienen todavía atractivo tecnológico académico. Hasta la fecha otras numerosas especies también tienen un interés particular y este grupo aumentará rápidamente en los próximos años.

25 Los azúcares, la clase de moléculas más abundante en la naturaleza, son utilizados por todas las levaduras conocidas. Aunque hay grandes diferencias en la aceptación del sustrato entre especie y especie (véase la Tabla 1), la conversión de glucosa 6-fosfato o fructosa 6-fosfato en piruvato es un tema común en su metabolismo. De cualquier manera, el equipamiento enzimático para la ruta glicolítica varía significativamente entre las diferentes levaduras. Si bien en *S. cerevisiae* la mayoría de las enzimas son conocidas y están caracterizadas, al menos parcialmente, en las NCY solamente se describieron unas pocas enzimas. Algunas de las funciones necesarias para la glicólisis están mediadas por numerosos genes/enzimas en algunas levaduras, especialmente aquellas que juegan un papel adicional en el control o la regulación del metabolismo y/o que están en un punto de ramificación como glucoquinasa/hexoquinasa, fosfofructoquinasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Normalmente, las isoenzimas se regulan diferencialmente indicando diversas funciones bajo pre-requisitos medioambientales cambiantes. Algunos de los genes que codifican enzimas glicolíticas son constitutivos y altamente expresados, p. ej. el gen *PGK1* (fosfoglicerato quinasa) de *S. cerevisiae* o *GAP* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *P. pastoris* mientras otras enzimas son estrictamente reguladas como el gen de la *ENO1* (enolasa) de *S. cerevisiae*.

40
45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 358 086 T3

TABLA 1

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

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<i>Levadura</i>	<i>Metabolismo energético</i>	<i>Sustratos seleccionados</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Crabtree positivo	sacarosa, maltosa, rafinosa, etanol
<i>S. pombe</i>	Crabtree positivo	sacarosa, maltosa, rafinosa
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Crabtree positivo	ácido acético, etanol, glicerol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Crabtree negativo	n-alcanos, ácidos grasos, etanol
<i>Pichia stipitis</i>	Crabtree negativo	xilosa
<i>Pichia pastoris</i>	Crabtree negativo	metanol, glicerol
<i>Hansenula polymorpha</i>	Crabtree negativo	metanol, glicerol
<i>Schwanninomyces occidentalis</i>	Crabtree negativo	almidón, n-alcanos, xilosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa, lactosa, etanol
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Crabtree negativo	lactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, etanol, glicerol, xilitol, lactato

60 El destino del piruvato en el metabolismo varía significativamente entre las especies de levadura y las condiciones de cultivo. En *S. cerevisiae* y otras levaduras denominadas Crabtree positivas, la respiración es inhibida por la glucosa y azúcares afines. Esto conduce a la transformación de piruvato vía piruvato descarboxilasa en etanol y CO₂, incluso con grandes cantidades de oxígeno, lo que también es conocido como fermentación. En las levaduras Crabtree negativas, a la que pertenecen la mayoría de las NCY, la transformación de piruvato en etanol se produce solamente en condiciones anaerobias. En condiciones aerobias el piruvato se oxida a CO₂ vía piruvato deshidrogenasa y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El ciclo de los TCA tiene un interés excepcional para el metabolismo celular debido al hecho de que esta es la única vía de oxidación de los azúcares a CO₂. La oxidación a CO₂ da como resultado la producción de NADH, que se utiliza para la producción de energía. Además, los intermediarios del ciclo de los TCA son las principales

fuentes de metabolitos con fines biosintéticos. Debido a la eliminación de intermedios el ciclo de los TCA debe ser recargado para mantenerse en funcionamiento. Las principales reacciones anapleróticas en levaduras son la piruvato carboxilasa y el ciclo del glioxilato. La primera es la ruta principal cuando se desarrolla sobre amonio como única fuente de nitrógeno mientras el último es necesario cuando se desarrolla sobre fuentes de carbono con menos de 3 átomos de carbono. En contraste con este eminente interés no se conoce apenas nada acerca de los genes o enzimas implicados en el ciclo de los TCA en las NCY. El NADH generado por las reacciones catabólicas, ya sea en el citosol o en las mitocondrias, tiene que ser re-oxidado a NAD^+ para mantener las reacciones en funcionamiento. En las levaduras Crabtree negativas (p. ej. *Pichia pastoris*) en condiciones aerobias el NADH es re-oxidado principalmente a través de la cadena respiratoria. La situación es significativamente diferente en las levaduras Crabtree positivas como *S. cerevisiae* donde coexisten respiración y fermentación. Cuando se desarrolla sobre glucosa en condiciones aerobias, la respiración es reprimida por la glucosa y se produce la fermentación. En estas condiciones el NAD^+ es regenerado por la formación de etanol (NADH producido por glicólisis) o glicerol. La respiración en levaduras difiere del paradigma animal de esta ruta descrito en cualquier libro de texto de bioquímica. Primero, algunas levaduras, como *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, carecen del complejo I de la cadena respiratoria. En estas levaduras la regeneración de NAD^+ se realiza sin bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna por las NADH deshidrogenasas externa e interna. La segunda diferencia principal, encontrada en las levaduras Crabtree negativas, hongos y plantas, es una ruta de respiración alternativa paralela al complejo III y IV de la cadena del citocromo. Esta respiración alternativa está mediada por la denominada oxidasa alternativa que transfiere electrones directamente desde la reserva de ubiquinona a oxígeno sin bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna.

El NADPH para fines biosintéticos se produce en la porción oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PPP). Otros metabolitos muy importantes proporcionados por esta ruta son la ribosa 5-fosfato y la eritrosa 4-fosfato, necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y cofactores de nucleótidos y para la síntesis de aminoácidos aromáticos, respectivamente. Todavía existen muchos vacíos en la información sobre los genes y sus correspondientes enzimas implicados en la PPP en las levaduras no convencionales. Se aislaron unas pocas enzimas de *Candida utilis*, *S. pombe* y *K. lactis*. La caracterización composicional y cinética reveló varias diferencias entre estas enzimas. Debido a la carencia de información, no se puede estimar la influencia de la PPP en estas levaduras pero se ha demostrado que p. ej. los mutantes para la fosfoglucosa isomerasa de *K. lactis*, que carecen de glicólisis, son capaces de crecer en medio con glucosa, en contraste con *S. cerevisiae*. Esta observación indica que la capacidad de la ruta de las pentosas fosfato en *K. lactis* es suficiente para el crecimiento sobre glucosa como fuente de carbono. En levaduras metilotróficas, se pudo encontrar una transcetolasa adicional (dihidroxiacetona sintasa). Esta enzima está localizada 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 eucarióticos 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 simples, seguras y por lo tanto baratas (a gran escala), con la ventaja principal de los sistemas de expresión eucarióticos, esto es el procesamiento de proteínas eucariótico. Debido a las razones mencionadas anteriormente *S. cerevisiae* ha dominado este campo durante muchos años dando como resultado un gran número de proteínas (p. ej. insulina, HBsAg, HSA) producidas en este organismo. *S. cerevisiae* muestra ciertas limitaciones debido a la hiperglicosilación, retención de las proteínas secretadas en el espacio periplásmico, inestabilidad plasmídica y bajos rendimientos de producto. Para superar las limitaciones de este organismo sencillo se ha desarrollado un pequeño grupo de levaduras no convencionales como anfitriones para la expresión de genes heterólogos. Entre otros se utilizaron *K. lactis*, *Y. lipolytica* y las levaduras metilotróficas *Candida boidinii*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*, pero solamente las 2 últimas especies adquirieron interés comercial excepcional. *Schizosaccharomyces pombe* muestra ciertas características con íntima proximidad a eucariotas superiores lo que hace de esta levadura un anfitrión muy atractivo para la producción de proteína heteróloga: (1) el mecanismo de inicio de la transcripción es más similar al de los eucariotas superiores, (2) algunos promotores de mamífero son funcionales en *S. pombe*, (3) la capacidad de empalme de ARN, destacando en una similitud de componentes del espliceosoma con el de los mamíferos, (4) la señal de retención del retículo endoplásmico de mamíferos KDEL puede ser reconocida, (5) existencia de residuos de galactosa en las glicoproteínas y (6) algunas otras modificaciones post-traduccionales como la acetilación y la isoprenilación de proteínas se realizan de una manera más similar a la de los mamíferos que a la de las células de levadura. Varios de los rasgos mencionados antes podrían aumentar la importancia de *S. pombe* en la producción de proteína recombinante en el futuro próximo con respecto a la producción de proteínas heterólogas auténticas y sus aplicaciones de alto rendimiento, como la 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 exacta a estas restricciones medioambientales es el principal factor que controla el crecimiento y otros parámetros fisiológicos de todos los organismos. Para la levadura, como para la mayor parte de los microorganismos, la glucosa es la fuente de carbono y energía preferida. Por lo tanto no es sorprendente que la glucosa, el monosacárido más abundante en la naturaleza, sea el mensajero principal para las células afectando al crecimiento y desarrollo de estos organismos por medio de la regulación de la expresión génica, principalmente, pero no exclusivamente, a nivel de control de la transcripción. El análisis de la transcripción genómica reveló que una cantidad considerable de genes está regulada por el nivel de glucosa determinado medioambientalmente. Los genes con una función metabólica conocida en la utilización de la glucosa como los transportadores de glucosa de baja afinidad y las enzimas glicolíticas así como los genes que codifican proteínas ribosomales están inducidos por glucosa. Por otra parte, la glucosa reprime un gran grupo de genes, incluyendo los genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas, la gluconeogénesis, el ciclo del glioxilato, las funciones peroxisómicas y la res-

piración. La represión de la respiración (efecto Crabtree) se produce solamente en unas pocas especies de levadura (levaduras fermentativas, Crabtree positivas) como *Saccharomyces cerevisiae* mientras en la mayoría de las especies de levadura la glucosa no reprime la respiración (Crabtree negativas). Aunque se ha logrado un amplio conocimiento de la maquinaria de represión de la glucosa a lo largo de los últimos 20 años, basado principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, su mecanismo real, especialmente las porciones aguas arriba de la detección y la señalización de la glucosa, no es completamente comprendido. Sin embargo, para obtener una mejor comprensión del presente trabajo, se describen brevemente a continuación unos pocos actores de la represión de los catabolitos carbonados para *S. cerevisiae*.

El gen *SNF1* codifica una proteína/quinasa Ser/Thr que puede ser encontrada en complejos de elevada masa molecular en células de levadura. Está regulado por cambios conformacionales en el complejo causados por la fosforilación en la subunidad reguladora de Snf1p. Hasta la fecha se han identificado 3 quinastas aguas arriba (Pak1p, Elm1p y Tos3p) para fosforilar y por lo tanto activar Snf1p. Su actividad es absolutamente necesaria para la des-represión de una amplia variedad de genes reprimidos por glucosa. Por consiguiente no es sorprendente que Snf1p o sus homólogos estén ampliamente conservados en eucariotas.

La proteína en dedo de cinc Mig1p es capaz de unirse a regiones promotoras de una amplia variedad de genes reprimidos por glucosa. Está actuando muy probablemente mediante el reclutamiento del complejo represor general Ssn6(Cyc8)-Tup1p. La función de Mig1p está controlada por la proteína quinasa Snf1, aunque todavía no hay una evidencia clara de una fosforilación directa. Mig1p está localizada en el núcleo en su forma no fosforilada. El agotamiento de la glucosa ocasiona la fosforilación de Mig1p seguido de translocación al citoplasma. Cuando se añade glucosa a las células Mig1p vuelve rápidamente al núcleo y reprime la transcripción.

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

Para un número grande de genes incluyendo muchos de los genes implicados en el metabolismo respiratorio la transcripción es activada sobre fuentes de carbono no fermentables por el complejo Hap2/3/4/5. Para unos pocos genes implicados en la respiración como *CYC1* (que codifica el iso-1-citocromo c) y *COX6* (subunidad VI de la citocromo c oxidasa) se ha establecido que Snf1 es necesaria para la des-represión después del crecimiento sobre glucosa. La transcripción de *HAP4* es reprimida cuando está presente glucosa, sin embargo no se pudo demostrar una implicación directa de Hap4p o Snf1p en la des-represión.

Gcr1p es una proteína activadora de la transcripción principal de los genes glicolíticos (p. ej. enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Gcr1p, junto con el factor de transcripción general Rap1p es el principal punto de la expresión de genes glicolíticos con respecto a la coordinación de la transcripción y es absolutamente necesaria para un elevado nivel de expresión. El patrón de expresión genómica de *S. cerevisiae gcr1* de tipo salvaje y mutante que crece sobre diferentes fuentes de carbono reveló 53 marcos de lectura abiertos (ORF), incluyendo los genes de la glicólisis, como dependientes de Gcr1p.

Esta descripción de algunos factores de transcripción y de la ruta Snf1p y Mig1p debe proporcionar una breve perspectiva general de algunos participantes en la trama de represión de la glucosa. Se debe observar que hay más ciclos reguladores que la ruta de Snf1p para la regulación de la glucosa. Aunque se ha logrado un amplio conocimiento de la detección y señalización de la glucosa los últimos 20 años, las principales cuestiones todavía están sin responder: cuál es la naturaleza de la señal de glucosa y cómo son reguladas e integradas las rutas de señalización conocidas.

Un número limitado de especies de levadura es capaz de crecer sobre metanol como única fuente de carbono y energía. Pertenecen a uno de los cuatro géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* y *Torulopsis* y comparten una ruta de utilización de metanol general que es expresada después de la des-represión o inducción con metanol (véase 1.3.1). Puesto que las reacciones iniciales de esta ruta están compartimentadas dentro de peroxisomas, estos orgánulos también son inducidos. Debido a la fuerte inducción de los peroxisomas, las levaduras *Candida boidinii*, *Pichia metanolica*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* se utilizan frecuentemente en la biología celular para estudiar la biogénesis y la función de los peroxisomas.

Como se ha mencionado antes las levaduras metilotróficas comparten una ruta de utilización de metanol común. La primera etapa es la oxidación de metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno, catalizada por alcohol oxidasas (AOX, EC 1.1.3.13). El H₂O₂ tóxico se disocia en oxígeno y agua por la acción de la catalasa. Ambas enzimas son secuestradas en los peroxisomas. El formaldehído es oxidado por dos reacciones con deshidrogenasa posteriores o asimilado en el metabolismo celular mediante condensación con xilulosa 5-fosfato (Xu5P). El formaldehído se oxida a formiato y adicionalmente a dióxido de carbono mediante formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (GSH) y formiato deshidrogenasa, localizadas ambas en el citosol. El NADH, generado en ambas reacciones, se utiliza para producir energía para el crecimiento sobre metanol. La reacción de condensación tiene lugar dentro de los peroxisomas y está catalizada por la transcetolasa dihidroxiacetona sintasa mencionada antes. Los compuestos C3 resultantes, la dihidroxiacetona (DHA) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) se metabolizan adicionalmente en el

citósol. Después de la fosforilación de DHA, se forma fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) mediante una reacción aldolasa de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y GAP. La FBP se convierte en fructosa 6-fosfato mediante una fosfatasa y la xilulosa 5-fosfato (Xu5P) se regenera en la ruta de las pentosas fosfato. Un tercio del GAP generado entra en la ruta de la gluconeogénesis para la síntesis de constituyentes celulares.

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

En *H. polymorpha* y *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. metanolica* (*AUG1* y *AUG2*, gen que utiliza alcohol, o *MOD1* y *MOD2*), siendo *Aox1p* y *Aug1p* la principal alcohol oxidasa. La comparación de las regiones codificantes reveló una similitud del 73-85% a nivel de aminoácidos entre las levaduras metilotróficas [1]. La homología entre los ORF (marcos de lectura abiertos) de *AOX1* y *AOX2* de *P. pastoris* es del 92% y 97% a nivel de secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente [2, 3]. La alcohol oxidasa es una flavoproteína octamérica que contiene un FAD unido no covalentemente o un análogo modificado (mFAD) por subunidad. La traducción de *AOX* se produce sobre los ribosomas libres seguido de una importación post-traduccional en los peroxisomas. La traslocación en los peroxisomas está dirigida por una secuencia PTS1 (señal de direccionamiento de peroxisoma de tipo 1) en su extremo C terminal. Los oligómeros de *Aox* se forman solamente después de la importación en la matriz del peroxisoma.

En *C. boidinii* y *P. pastoris* no se pudieron encontrar oligómeros *Aox* en el citósol en contraste con la dihidroxiacetona sintasa, que forma un dímero en el citósol antes de su translocación a la matriz peroxisómica. No solamente la secuencia promotora de la alcohol oxidasa I de *Pichia pastoris*, si no también la enzima tienen un interés biotecnológico debido a una amplia gama de sustrato (alcoholes primarios insaturados y saturados con una longitud de cadena de corta a moderada) y una elevada estabilidad en diferentes condiciones de reacción. La regulación de todos los genes de alcohol oxidasa se produce a nivel de la transcripción y muy probablemente en la fase de inicio de la transcripción. Aunque *AOX1* y *AOX2* son regulados de un modo similar (ARNm no detectable sobre glicerol o glucosa, detectable en la fase de agotamiento de carbono, elevadas cantidades en metanol), sus 5 regiones limítrofes no comparten una homología significativa [2, 4].

Cada locus *AOX* muestra un supuesto sitio de unión a ARN polimerasa (TATAAA; caja Goldberg-Hogness o TATA) en la posición -43 con respecto al sitio de inicio de la transcripción primario. Ambas secuencias líder del ARNm de *AOX* de *P. pastoris* son extremadamente ricas en residuos A e inusualmente largas para las levaduras (115 nucleótidos (nt) para *AOX1* y 160 nt para *AOX2*). Las regiones de inicio de la traducción en torno al codón de iniciación ATG (secuencia Kozak; *AOX1*: CGAAACG ATG GCT, *AOX2*: GAGAAA ATG GCC) coinciden con las secuencias consenso descritas previamente para *S. cerevisiae* y eucariotas superiores. El papel fisiológico del segundo gen de alcohol oxidasa en *P. pastoris* y *P. metanolica* todavía no está claro. La desorganización de *AOX1* o *AUG1* ocasiona graves defectos en el crecimiento en estas cepas (el denominado fenotipo lento de utilización de metanol (*Mut^s*)) mientras las cepas *aox2* y *aug2* muestran tasas de crecimiento comparables con las de la cepa de tipo salvaje. Se observaron 9 formas múltiples de alcohol oxidasa en *P. metanolica* que representan una oligomerización al azar de los 2 productos génicos *Aug1p* y *Aug2p*. *AUG1* y *AUG2* están regulados diferencialmente: en el agotamiento del carbono y la baja concentración de metanol solamente se pudo detectar *Aug1p*, y con una concentración creciente de metanol aumenta la razón de *Aug2p* a *Aug1p*. El desplazamiento a octámeros con un elevado contenido de *Aug2p* se debe a un incremento en la expresión de *AUG2*, regulado a nivel de la transcripción. Los valores de *K_m* para el metanol de los dos homooctámeros de *Aug1p* y *Aug2p* son de aproximadamente 0,56 y 5,6 mM, respectivamente. Junto con el descubrimiento, esa interrupción de *AUG1* ocasiona un defecto en el crecimiento a bajas concentraciones de metanol [5], estos resultados implican que *AUG2* es una ventaja para *P. metanolica* cuando crece a concentraciones superiores de metanol. En *Pichia pastoris* ni el papel del gen *AOX2* fue analizado con mayor detalle ni fueron favorables las condiciones para poseer un segundo gen de alcohol oxidasa encontrado. Puesto que las condiciones de laboratorio representan solamente una fracción muy pequeña de las condiciones a las que se enfrentan los microorganismos de vida libre, debe haber situaciones en la naturaleza en las que el gen *AOX2* tenga una importancia selectiva para *P. pastoris*.

La expresión de *AOD1* de *C. boidinii* y *MOX* de *H. polymorpha* es estrictamente reprimida durante el crecimiento sobre glucosa o etanol como única fuente de carbono, des-reprimida sobre glicerol y fuertemente inducida sobre metanol. La expresión de estas dos enzimas también es reprimida cuando están presentes glucosa y metanol en el medio. Si está presente glicerol el metanol es capaz de inducir la expresión génica. La transcripción de *AOD1* y *MOX* también es des-reprimida en el agotamiento de carbono y reprimida cuando se encuentra presente etanol [6-9]. Dos mecanismos reguladores distintos son 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* es reprimido cuando están presentes en el medio glucosa, etanol o glicerol (a concentraciones no limitantes del crecimiento). La des-represión en el agotamiento del carbono y la inducción por metanol son similares para *AOD1* y *MOX*. Las fuentes de carbono con las cuales la expresión de *AOX1* es des-reprimida son p. ej. sorbitol, manitol, trehalosa y alanina [12].

Tras el cambio de metanol a una fuente de carbono represora como glucosa o etanol, los peroxisomas son degradados en horas durante la adaptación a la nueva fuente de carbono. La degradación proteolítica en las vacuolas de la levadura sigue de nuevo dos mecanismos distintos cuando se adapta a glucosa o etanol, denominados micro- y macroautofagia, respectivamente.

5

Como se ha mencionado antes, las levaduras metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* son ampliamente utilizadas para la producción de proteína recombinante. Hasta ahora, se han producido más de 500 proteínas en *P. pastoris*. Su desarrollo fue dirigido por unas pocas características, que les proporcionan ventajas entre los anfitriones recombinantes: 1) comparten las ventajas generales de las levaduras en términos de manipulación genética y tecnología de cultivo (A escala de laboratorio y a gran escala); 2) la capacidad para crecer a densidades celulares extremadamente elevadas; y 3) el elevado nivel de producción de proteína recombinante (secretada o intracelular). Los promotores inducibles fuertes de los genes que codifican reacciones de la ruta de utilización del metanol fueron desarrollados para la producción de proteína recombinante. Los más ampliamente utilizados son las regiones promotoras de los genes de la alcohol oxidasa *AOX1* y *MOX* de *P. pastoris* y *H. polymorpha*, respectivamente. Pero también se utilizaron otras regiones promotoras de los genes de la ruta de utilización de metanol para dirigir la producción de proteína recombinante: los promotores *FMD* (formiato deshidrogenasa) y *DASI* (dihidroxiacetona sintasa) de *H. polymorpha* y *C. boidinii* y el promotor *FLD1* (formaldehído deshidrogenasa) de *P. pastoris*. El último también puede ser inducido con metilamina como única fuente de nitrógeno con glucosa como fuente de carbono. Los promotores para la expresión constitutiva de genes foráneos también se encuentran disponibles: el elemento promotor GAP (glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *P. pastoris* y el promotor *PMA1* (que codifica H⁺-ATPasa de la membrana plasmática) de *H. polymorpha*. Se desarrollaron varias combinaciones de cepa anfitriona auxotrófica/gen marcador para *P. pastoris* (p. ej. *HIS4*) y *H. polymorpha* (p. ej. *LEU2* y *URA3*). Los marcadores de selección dominante también se encuentran disponibles p. ej. Zeocina[®], resistencia a G418). La integración del gen en levaduras metilotróficas se realiza principalmente (si no exclusivamente) mediante integración homóloga. Los vectores que portan una región ARS (secuencia autónomamente replicante) también se encuentran disponibles pero normalmente son bastante inestables si la presión de selección se libera, lo que da como resultado su aplicación tecnológica limitada. En *P. pastoris* el gen foráneo es integrado de manera específica del sitio en el locus *AOX1* o *HIS4*. Otros posibles sitios de integración son p. ej. el locus GAP (para la expresión de GAP) o cualquier otro locus para marcadores de selección (p. ej. *ADE1*, *URA3*, *ARG4* y *LEU2*). En *H. polymorpha* se integran al azar casetes de expresión en una disposición cabeza-cola que conduce a integrantes mitóticamente estables con un elevado número de copias (hasta 100). Sin embargo, un elevado número de copias a menudo no dan como resultado un elevado nivel de expresión. Otros factores de gran influencia son: la estructura de la casete de integración, la naturaleza y estructura de la proteína que va a ser expresada y el sitio de integración. Especialmente la estructura de la casete de integración tiene una gran influencia sobre el efecto de la dosificación del gen. Un estudio adicional de cómo optimizar la casete de expresión y la dosificación del gen se proporciona en [13, 14]. Las levaduras metilotróficas pertenecen al grupo de levaduras Crabtree negativas teniendo lugar de ese modo la producción de etanol a un nivel muy bajo cuando crecen en condiciones aerobias. Debido a este hecho, estas levaduras se pueden hacer crecer a densidades celulares muy elevadas en cultivos en fermentadores dando como resultado rendimientos de producto muy elevados. La producción de proteína conducida por *AOX1* se puede incrementar adicionalmente 3-5 veces cuando la concentración de metanol en el biorreactor se encuentra en esferas limitantes del crecimiento. El hecho de que *P. pastoris* secrete en condiciones convencionales solamente bajas cantidades de proteínas endógenas hace de cada proteína recombinante secretada la más abundante del medio. La secreción puede servir como una primera etapa sustancial en el procedimiento de purificación aguas abajo. Para la secreción de proteína, la secuencia líder prepro MF α 1 (factor de apareamiento α) de *S. cerevisiae* y las secuencias derivadas de la fosfatasa ácida (*PHO1*) son ampliamente utilizadas en *P. pastoris* y *H. polymorpha*. En algunos casos se obtuvo secreción suficiente con proteínas de plantas, hongos y mamíferos que portaban sus señales de secreción naturales. Como se ha mencionado antes, las levaduras son capaces de realizar modificaciones postraduccionales como la formación de enlaces disulfuro, el procesamiento de secuencias señal (p. ej. secuencia líder prepro de MF α 1), adición de lípidos y glicosilación unida a N y O. Si bien en células de mamífero se producen estructuras de oligosacáridos unidos a N y O muy complejas compuestas por una variedad de azúcares (p. ej. N-acetilglucosamina, galactosa, y ácido siálico), la mayor parte de las levaduras generan estructuras de tipo alto contenido de manosa carentes de algunas entidades de azúcar como galactosa o ácido siálico. Estas estructuras no de mamífero pueden producir graves problemas para la aplicación terapéutica debido principalmente a su elevada inmunogenicidad potencial. En *H. polymorpha* y *P. pastoris*, en contraste con *S. cerevisiae*, la hipermanosilación es menos abundante y no se incorporan manosas conectadas a α -1,3 terminales hiper-inmunogénicas a los oligosacáridos unidos a N. Para superar estos problemas de inmunogenicidad (y algunos otros como la baja estabilidad en el flujo sanguíneo), los esfuerzos están encaminados a humanizar estructuras de oligosacáridos derivadas de levadura, y, como revela la literatura reciente, especialmente en *P. pastoris*. Hasta la fecha, la inmensa mayoría de los artículos de investigación y los procedimientos comerciales tienen que ver con la levadura bien conocida *S. cerevisiae*. Debido a un conocimiento creciente de las levaduras no convencionales, junto con las ventajas aparentes en términos de fermentación a gran escala y los problemas de glicosilación, *H. polymorpha* y *P. pastoris* se están convirtiendo rápidamente en la levadura de elección. Esto se enfatiza por el hecho de que numerosos procedimientos de producción fueron implementados en la industria.

En el documento WO 02/081650 se describe la identificación de regiones del promotor *AOX1*, que puede ser utilizado para la construcción de promotores de *AOX1* mutantes. Puesto que las regiones de la secuencia suprimida del promotor de *AOX1* descritas allí son muy largas, se puede observar un efecto acumulado y no los efectos individuales de las distintas secuencias reguladoras del promotor. No obstante, semejante enfoque no permitirá el desarrollo de promotores fuertemente intensificados. Especialmente cuando se construyen nuevos promotores que tienen rasgos

65

mejorados suprimiendo o duplicando porciones del promotor original se requiere el conocimiento de la secuencia reguladora exacta.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un promotor de *AOXI* mejorado con propiedades intensificadas para facilitar el procesamiento aguas abajo en la producción de proteínas, para incrementar los rendimientos tiempo-espacio y para ayudar a elevar el nivel de calidad del producto.

Otro objeto es proporcionar un promotor de *AOXI* fuerte en un vector o una cepa anfitriona que anticipe parcial o totalmente la represión por glucosa. Resulta ventajoso tener un promotor que conduzca la expresión fuerte en presencia de elevadas concentraciones de glucosa.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un promotor de *AOXI* que permita la producción de una proteína empleando una cantidad reducida de metanol o sin metanol. Tales promotores tendrían un impacto significativo sobre los procedimientos de producción industrial. Debido a problemas de seguridad se necesita un equipamiento especial para las plantas de producción que emplean metanol como inductor. Esto contradice las aplicaciones de *Pichia pastoris* en plantas de producción mucho menos especializadas. Además la estabilidad de las proteínas en presencia de metanol puede dificultar la inducción basada en metanol de la expresión de proteínas. Esto es menos crítico para la producción de proteínas industriales robustas, pero se convierte en un problema principal p. ej. para las proteínas terapéuticas secretadas.

La construcción de tales promotores requiere el conocimiento de las porciones específicas (p. ej. elementos reguladores, sitios de unión del factor de transcripción) del promotor de *AOXI* de *Pichia pastoris* de tipo salvaje que -cuando muta de algún modo- muestra un efecto sobre el comportamiento de la expresión. Por lo tanto un objeto de la presente invención es identificar estas porciones y proporcionar por lo tanto los medios para crear promotores de *AOXI* con características mejoradas.

Por lo tanto la presente invención se refiere a un promotor de alcohol oxidasa 1 (*AOXI*) de *Pichia pastoris* mutante del promotor de *AOXI* de *Pichia pastoris* de tipo salvaje (SEQ ID No. 1) como se define en las reivindicaciones. Dicho promotor mutante puede comprender adicionalmente una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un sitio de unión del factor de transcripción (TFBS),
- b) los nucleótidos 170 a 235 (-784 a -719), los nucleótidos 170a 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) del SEQ ID No. 1, y sus combinaciones. Los números (negativos) entre paréntesis a lo largo de toda la memoria reflejan las correspondientes posiciones del promotor con respecto al codón de inicio de la traducción (p. ej. ATG). Por ejemplo, "A" de "ATG" en una secuencia de ácido nucleico que comprende $N_x\text{GACTATGN}_y$ corresponde a la posición +1, mientras la "T" antes de "A" de "ATG" corresponde a la posición -1.

De acuerdo con la presente invención el promotor de *AOXI* mutante comprende al menos una mutación en un sitio de unión al factor de transcripción y/o uno de los intervalos de secuencia del ácido nucleico esbozados antes. Resultó que especialmente estas regiones del promotor de *AOXI* son adecuadas para modificar dicho promotor con el fin de alterar sus características. Por su puesto también se puede introducir una combinación de las mutaciones esbozadas antes para mejorar los rasgos característicos de un promotor de *AOXI* (p. ej. dos mutaciones TFBS seleccionadas de a), una mutación 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 se puede combinar con una mutación en los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) y/o los nucleótidos 207 a 209 (-747 a -745) del SEQ ID No. 1. La expresión de una proteína bajo el control de un promotor de *AOXI* en *Pichia pastoris* es inducida generalmente por la adición de metanol e inhibida por la presencia de glucosa en el medio. Con el fin de aumentar o reducir el efecto de dichos aditivos del medio sobre la expresión de las proteínas, el promotor es mutado preferiblemente en las regiones promotoras como se ha esbozado antes. La eficacia de los promotores de *AOXI* mutados para producir una proteína de interés varía dependiendo de la cantidad (esto es las copias) del vector integrado en el cromosoma del anfitrión. Especialmente resultó que las cepas con múltiples copias muestran efectos promotores mejorados. Puesto que la resistencia a antibióticos de las cepas de *Pichia* depende del número de casetes de resistencia a antibióticos (los vectores introducidos en un anfitrión comprenden preferiblemente un casete de resistencia a antibiótico que permite al anfitrión crecer sobre/en un medio que comprende un antibiótico como marcador selectivo) integradas en el cromosoma de dicho anfitrión, se pueden producir cepas con múltiples copias aplicando concentraciones crecientes de antibiótico (en el intervalo de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 10 mg/ml , preferiblemente 50 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$; dependiendo del antibiótico utilizado; por ejemplo, geneticina: 0,1 a 10 mg/ml , preferiblemente 0,2 a 5 mg/ml , concretamente 0,25 a 4 mg/ml , zeocina: 10 a 5000 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 50 a 3000 $\mu\text{g/ml}$, concretamente 100 a 2000 $\mu\text{g/ml}$) sobre placas de agar selectivo para incrementar la presión de selección (p. ej. [14]; Scorer, C.A. *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12:181-184). Sin embargo, se encontró

ES 2 358 086 T3

que el crecimiento de las células que albergan una multiplicidad de casetes de resistencia a antibiótico no depende solamente de la concentración de antibiótico si no que también depende del tiempo. Por lo tanto, las cepas con múltiples copias son capaces de crecer hasta una colonia detectable sobre un medio que contiene la misma concentración de antibiótico en un período de tiempo más corto que las cepas con una única copia. Este compartimento permite al experto en la técnica detectar y aislar cepas de múltiples copias antes de que las cepas de una sola copia comiencen a crecer. Por ejemplo, una cepa que alberga una única copia de un casete de resistencia a antibiótico crece sobre una placa de agar hasta un tamaño de colonia detectable en 72 h, mientras la misma cepa que alberga más de una copia de dicha casete crece en 24 a 48 h hasta el mismo tamaño.

10 Especialmente las cepas con múltiples copias que albergan un promotor de *AOX1* con mutaciones en los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y en los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) mostraron un aumento sorprendente de las tasas de expresión.

15 Con el fin de incrementar la eficacia de expresión de proteínas de un anfitrión en presencia de metanol, se mutan preferiblemente los nucleótidos 170 a 235 (-784 a -719) del promotor de *AOX1* (SEQ ID No. 1). Una mutación en esta región aumenta la expresión de proteína de 120 a 130% en comparación con el promotor de *AOX1* de tipo salvaje, siempre que el plásmido que porta el promotor de *AOX1* mutante esté integrado solamente una vez en el cromosoma/genoma del anfitrión (mutante de una sola copia). No obstante, las mutaciones dentro de todas las regiones mencionadas antes reducen o no afectan a la eficacia del metanol para inducir la expresión de proteína. En contraste con esto, las mutaciones en las regiones promotoras del promotor de *AOX1* de tipo salvaje (como se ha esbozado antes) conducen -dependiendo de la mutación- a un incremento o disminución de la expresión de proteína en condiciones de des-represión (p. ej. véase la Tabla 13, ejemplo 1).

25 No obstante, las cepas recombinantes que albergan más de una copia de los promotores de *AOX1* mutados dan como resultado cepas que tienen una actividad incrementada en condiciones de des-represión e inducida por metanol (cepas de múltiples copias, p. ej. véase la Fig. 7, ejemplo 2). En detalle, las cepas con múltiples copias que albergan mutaciones en los nucleótidos 694 a 723 del SEQ ID No. 1 (d6), en los nucleótidos 694 y 723 (-260 y -231) del SEQ ID No. 1 (d6), en los nucleótidos 694 y 723 (-260 y -231) y en los nucleótidos 304 y 350 (-650 y -604) del SEQ ID No. 1 (d2d6), en TFBS, especialmente en Rap1, Gcr1, QA-1F, Hsf_1, Adr1, Hsf_2, Mat1MC, abaA y Hap2345, muestran un incremento de la expresión en condiciones de des-represión y/o de inducción con metanol en comparación con la expresión de proteínas bajo el control del promotor de *AOX1* de tipo salvaje. En condiciones de des-represión algunas de estas cepas con múltiples copias muestran expresiones de proteínas que han aumentado aproximadamente 10 veces en comparación con las expresiones bajo el control del promotor de tipo salvaje. En presencia de metanol como inductor la eficacia de expresión es intensificada 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 anfitrión en forma de múltiples copias, se emplean preferiblemente para la expresión de proteínas. La combinación de dos o más de las mutaciones mencionadas antes puede aumentar adicionalmente la fuerza del promotor (véase p. ej. la Fig. 7, ejemplo 2).

40 Los sitios de unión del factor de transcripción se pueden identificar experimentalmente (p. ej. mediante cambio de la movilidad o análisis de la huella genética) o mediante comparación de la secuencia con sitios de unión del factor de transcripción conocidos (p. ej. mediante análisis computarizado, [15]).

45 El conocimiento de las regiones promotoras que influyen en la fuerza y las características de dicho promotor puede ser utilizado para diseñar promotores con distintas propiedades (elevada expresión de proteína en condiciones de des-represión y/o elevada expresión de proteína en presencia de metanol). Además estas propiedades pueden ser mejoradas o alteradas si estos promotores mutantes se integran una o más veces en el genoma del anfitrión (p. ej. véanse los ejemplos 1 a 3).

50 Sin embargo, en algunos casos la actividad del promotor debe ser disminuida en lugar de aumentada. Especialmente se requiere en muchos casos que la co-expresión de proteínas reguladoras como las quinasas, fosforilasas y proteínas coadyuvantes, tales como p. ej. chaperonas, proteínas disulfuro isomerasa, isomerasas cis-trans, foldasas, proteínas disulfuro isomerasas y proteasas, sea baja en comparación con el producto principal, que puede ser producido por la célula con el promotor de tipo salvaje o con el promotor mejorado de acuerdo con la presente invención. Especialmente la expresión combinada de dos productos diferentes (p. ej. una proteína coadyuvante y el producto principal) bajo el control de un promotor de *AOX1* con una actividad incrementada y un promotor de *AOX1* con una actividad disminuida (en comparación con la actividad de tipo salvaje), respectivamente, resultó ser ventajosa, debido a que la tasa de expresión del producto principal y secundario difiere aún más con respecto al uso de promotores de *AOX1* de tipo salvaje. Se puede obtener una reducción de la expresión preferiblemente suprimiendo los sitios de unión al activador como HSF o HAP o insertando sitios de unión al represor en el promotor de *AOX1* de tipo salvaje. Por consiguiente, el uso del promotor de *AOX1* con una actividad reducida evita la sobrecarga de la maquinaria de expresión de proteínas de la célula, que tendría la consecuencia de que se podría reducir el rendimiento del producto principal. Por ejemplo, Bessette PH *et al.* (PNAS USA (1999) 96:13703-13708) pudieron demostrar que la expresión de un polipéptido activo se podría incrementar significativamente mediante la co-expresión de una tiorredoxina.

65 De acuerdo con una realización preferida el promotor comprende adicionalmente una mutación en los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y/o los nucleótidos 729 a 763 (-225 a -191) del SEQ ID No. 1.

ES 2 358 086 T3

Una mutación que afecta a estos intervalos de nucleótidos combinada con una mutación como se ha esbozado antes da como resultado una actividad del promotor incluso más intensificada. Por ejemplo, una doble mutación que afecta a los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) y a los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) del SEQ ID No. 1 conduce a un promotor que muestra niveles de expresión superiores en condiciones de des-represión así como en condiciones inducidas en comparación con los niveles de expresión en las mismas condiciones del promotor de tipo salvaje. El efecto de esta doble mutación puede ser intensificado cuando el ácido nucleico que comprende el promotor es introducido en la célula en más de una copia (dando como resultado un clon con múltiples copias).

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

Con el fin de modificar las características del promotor de *AOX1* de tipo salvaje de *Pichia pastoris* son posibles varios tipos de mutación. Los tramos del promotor que comprenden las regiones mencionadas antes (sitios de unión al factor 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) del SEQ ID No. 1) pueden ser parcial o completamente suprimidos, parcial o completamente sustituidos por otros nucleótidos o secuencias de ácido nucleicos, interrumpidos mediante la inserción de nucleótidos individuales o secuencias de ácido nucleicos, invertidos parcial o completamente o multiplicados. Todas estas mutaciones conducen a un cambio en la actividad del promotor, debido a que las características estructurales y/o los sitios de reconocimiento/unión p. ej. para los factores de transcripción resultan afectados por dichas mutaciones. No obstante, estos cambios pueden conducir a un incremento o disminución de la actividad del promotor en comparación en el promotor de tipo salvaje.

Es bien sabido en la técnica anterior que la multiplicación/duplicación de tramos de ácido nucleico específicos puede incrementar la actividad del promotor. La regulación de la expresión génica de muchos promotores eucarióticos, especialmente promotores de levadura, implica múltiples interacciones entre los factores de transcripción unidos en un promotor. Se pueden requerir múltiples sitios para el funcionamiento incluso de los elementos que actúan en cis más pequeños. En células de levadura, las secuencias activadoras aguas arriba (UAS) son necesarias para la transcripción. Funcionan en cualquier orientación y a una distancia variable con respecto a la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, pero en contraste con los intensificadores en eucariotas superiores, deben estar aguas arriba a partir de estos elementos basales. Las UAS son dianas de numerosos activadores transcripcionales.

La mayor parte de los fenómenos de represión en células de levadura resultan de la inactivación o ausencia de factores de transcripción. Sin embargo, también se pudieron identificar 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 activadoras aguas arriba (UAS1 y UAS2) y un sitio de unión al represor (URS1) [8]. También se pudieron encontrar las correspondientes secuencias sobre los promotores de *AOX1* (nucleótidos 585 a 614 (-369 a -340) y 725 a 756 (-229 a -198), que mostraban similitudes con las UAS de *AOX2* [3], así como los nucleótidos 622 a 656 (-332 a -298)[8]). La multiplicación (2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces UAS) de estos tramos de ácido nucleico puede dar como resultado un promotor con una fuerza mayor que conduce a una expresión de proteínas incluso más potente. Por lo tanto, la construcción de promotores que comprenden UAS múltiples, preferiblemente que implican a las regiones de secuencia mencionadas antes similares a las UAS de *AOX2* y *MOX*, u otros tramos de secuencia múltiple (p. ej. los intervalos de secuencia de ácido nucleico esbozados antes) también están dentro del alcance de la presente invención y se considera que son una realización preferida. Una secuencia activadora está normalmente a unos pocos cientos de pares de bases de un promotor. Por ejemplo, la mayor parte de las secuencias activadoras está a aproximadamente 200 a 400 pares de bases del promotor que está intensificado. Adicionalmente aguas arriba el promotor contiene normalmente intensificadores y sitios de unión al factor de transcripción adicionales.

Al menos una mutación del promotor *AOX1* puede ser introducida mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica (p. ej. 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 del factor 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 da como resultado promotores mutantes con características variables (véase el ejemplo 2).

Preferiblemente, el sitio de unión al factor de transcripción (TFBS) Hap1 comprende los nucleótidos 54 (-900) a 58 (-896) del SEQ ID No. 1, Hsf los nucleótidos 142 (-812) a 149 (-805) y 517 (-437) a 524 (-430) del SEQ No. 1, Hap234 los nucleótidos 196 (-758) a 200 (-754), 206 (-748) a 210 (-744) y 668 (-286) a 672 (-282) del SEQ ID No. 1, abaA los nucleótidos 219 (-735) a 224 (-730) del SEQ ID No. 1, Stre los nucleótidos 281 (-673) a 285 (-669) del

ES 2 358 086 T3

SEQ ID No. 1, Rap1 los nucleótidos 335 (-619) a 339 (-615) del SEQ ID No. 1, Adr1 los nucleótidos 371 (-583) a 377 (-577) del SEQ ID No. 1, Mat1MC los nucleótidos 683 (-271) a 687 (-267) del SEQ ID No. 1, Gcr1 los nucleótidos 702 (-252) a 706 (-248) del SEQ ID No. 1 y QA-1F los nucleótidos 747 (-207) a 761 (-193) del SEQ ID No. 1.

5 Estos TFBS pueden ser identificados experimentalmente o por comparación con TFBS conocidos de otros promotores (p. ej. promotores de eucariotas) con la ayuda de programas de ordenador (p. ej. véase el ejemplo 1).

Un resumen de la influencia de los promotores de AOX1 mutantes sobre la expresión de proteínas, péptidos o ácido nucleicos funcionales se proporciona en la tabla 2 (en comparación con la actividad del tipo salvaje).

10

TABLA 2

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

15

<i>Mutación</i>	<i>Clon de copia única</i>		<i>Clon de múltiples copias</i>	
	<i>Condiciones de Des-represión¹</i>	<i>Condiciones inducidas por Metanol¹</i>	<i>Condiciones de Des-represión¹</i>	<i>Condiciones inducidas por Metanol¹</i>
Δ Hap1		+		
Δ Hsf_1	-	+	+	+
Δ 1	+	+		
Δ Hap2345_1		+		+
Δ Hap2345_2	-	+		+
Δ abaA	-		+	+
Δ Stre	+	+		
Δ 2		-		

45

50

55

60

65

ES 2 358 086 T3

Mutación	Clon de copia única		Clon de múltiples copias	
	Condiciones de Des-represión ¹	Condiciones inducidas por Metanol ¹	Condiciones de Des-represión ¹	Condiciones inducidas por Metanol ¹
5 10 Δ Rap1	-		+	+
Δ 3	-	-		
15 Δ Adr1	-	-	+	+
Δ 4	-	-		
20 Δ Hsf_2				
Δ 5	-	-		
25 Δ Hap2345_3			+	+
Δ Mat1MC				
30 Δ 6	+	+	+	+
Δ 6*	+	-	+	+
35 Δ Gcr1	-	+	+	+
Δ 7	-	-		
40 Δ QA-1F	+		+	+
Δ QA-1Fzus	+	-		
45 Δ Hsf_2_dHa		+	+	+
p2345_1				
Δ Hsf_2_dHa		+		
50 p2345_1zus				
Δ Hsf_2_Mat1MC	-		+	+
55 Δ 8	-	-		
Δ 9	-	-		
60 Δ 2 Δ 6		-	+	+
Δ 736-41		-		

65

ES 2 358 086 T3

Mutación	Clon de copia única		Clon de múltiples copias	
	Condiciones de Des-represión ¹	Condiciones inducidas por Metanol ¹	Condiciones de Des-represión ¹	Condiciones inducidas por Metanol ¹
Δ737-38				
ΔInD-d4m				
ΔD-d4				
Δ1-1				
Δ1-2				
Δ1-3				
Δ1-SacI				
¹ Tasa de expresión en comparación con el promotor de AOX1 de tipo salvaje: - disminuida, + incrementada				

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante de acuerdo con la presente invención y un ácido nucleico que codifica una proteína, péptido o ácido nucleico funcional, donde el promotor y dicho ácido nucleico están conectados operablemente entre sí.

El promotor de AOX1 mutante puede ser conectado a un gen que codifica una proteína (p. ej. enzima), un péptido (p. ej. hormona) o un ácido nucleico funcional (p. ej. ARNsi). El fragmento de ácido nucleico resultante puede ser utilizado para expresar p. ej. una proteína cuando es introducida en un organismo, preferiblemente una levadura, especialmente una cepa de *Pichia pastoris*. La construcción de dicha molécula de ácido nucleico es bien conocida por el experto en la técnica y puede ser realizada con métodos de biología molecular convencionales (p. ej. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición), J. Sambrook y D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press; manual "Pichia Expression Kit", Invitrogen Corp.).

"Conectado operablemente" hace referencia a una primera secuencia o secuencias que están situadas suficientemente próximas a una segunda secuencia o secuencias de manera que las primeras secuencias pueden ejercer influencia sobre las segundas secuencias o una región bajo el control de esa segunda secuencia. Por ejemplo, un promotor puede estar conectado operablemente a un gen de manera que el gen sea expresado bajo el control del promotor, que estará típicamente 5' con respecto al gen. Normalmente, un promotor núcleo estará a unos pocos cientos de pares de bases del sitio de inicio de la traducción. Aproximadamente 30 pb aguas abajo hay normalmente un elemento promotor aguas abajo.

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

Con el fin de introducir el promotor mutante, opcionalmente conectado operablemente a un ácido nucleico que codifica una proteína, péptido o ácido nucleico funcional, en un anfitrión, preferiblemente en una cepa de levadura metilotrófica (p. ej. una cepa de *Pichia pastoris*), dicho promotor tiene que ser proporcionado en un vector, que puede ser utilizado para la transformación de dicho anfitrión. Por ejemplo, dichos vectores pueden ser plásmidos episómicos de levadura (YEpl), plásmidos de integración de levadura (YIp) o cromosomas artificiales de levadura. Tales vectores comprenden normalmente un origen de replicación (si fuera necesaria la amplificación en anfitriones microbianos) y un marcador de selección para la propagación de los vectores en *E. coli*, promotores y terminadores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura y marcadores de selección para levadura. Los vectores que no son de integración comprenden adicionalmente una secuencia replicante autónoma (ARS), que asegura la estabilidad del vector en la célula (p. ej. Myers, A. M., *et al.* (1986) Gene 45: 299-310). Los vectores de integración, que no albergan secuencias AR, comprenden regiones de secuencia que son homólogas a las regiones del genoma. Alternativamente se puede utilizar para la transformación ADN lineal, p. ej. originado a partir de PCR.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a una célula que comprende al menos un promotor de alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* mutante, al menos un fragmento de ácido nucleico o al menos un vector como se ha descrito en la presente memoria. La introducción de una molécula de ácido nucleico que alberga un promotor de *AOX1* mutante (p. ej. vector, donde el promotor está conectado operablemente a un ácido nucleico que codifica una proteína) en un anfitrión se puede realizar p. ej. mediante electroporación. Dicha molécula de ácido nucleico es integrada en el cromosoma después de su introducción en dicho anfitrión en una sola copia o en múltiples copias o presente en la célula como plásmido replicante autónomo de una sola copia o de múltiples copias. Si se utilizan varios promotores mutantes, pueden estar todos conectados con un único gen (que codifica una proteína o ácido nucleico funcional (p. ej. Ribozima, ARN antisentido etc.), una proteína idéntica o proteínas diferentes (p. ej. la variante del promotor 1 está conectada a un marcador de selección y otro promotor mutante está conectado con otra proteína que debe ser expresada). Por lo tanto en el alcance de la presente invención se producen preferiblemente cepas de una sola copia que comprenden una copia del promotor de *AOX1* conectado operablemente a un ácido nucleico que codifica una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcional así como cepas con múltiples copias 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* conectado operablemente 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 es una célula eucariótica, 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 *Torulopsis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*.

Los promotores de *AOX1* así como sus variantes mutadas pueden ser introducidos funcionalmente en un número muy grande de diferentes células de levadura, incluyendo células metilotróficas (p. ej. *Pichia pastoris*) y no metilotróficas (p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*). La transferibilidad de los promotores a otros organismos, especialmente promotores de *AOX1* y *MOX*, es conocida por un experto en la técnica. Aunque la especificidad de sustrato y algunos rasgos reguladores son diferentes en las diferentes levaduras (p. ej. *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* y *Saccharomyces cerevisiae*) se demostró un reconocimiento de los promotores foráneos (p. ej. 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* es reconocido en *S. cerevisiae*, reprimido en presencia de glucosa y des-reprimido bajo limitación de la fuente de carbono. De un modo similar el promotor de *AOX1* puede ser empleado en *H. polymorpha* y está regulado de la misma manera que el promotor de *MOX*. El promotor de *ZZA1*, que está íntimamente relacionado con el promotor de *AOX1* pudo ser empleado con éxito en *S. cerevisiae*.

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

- i) un vector como se ha definido antes, y
- ii) una célula capaz de 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 se puede utilizar en un kit para la expresión de una proteína seleccionada o la transcripción de un ARN funcional (p. ej. ribozima, ARN antisentido, ARNi).

De acuerdo con una relación 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 *Torulopsis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para la expresión de una proteína, péptido o 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, péptido o ácido nucleico funcional, estando conectado operablemente dicho promotor 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.

ES 2 358 086 T3

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 cepa de levadura metilotrófica se selecciona del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*, especialmente una célula de *Pichia pastoris*. Otro aspecto de la presente invención hace referencia 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, péptido o ácido nucleico funcional.

Cuando se utiliza una molécula de ácido nucleico, un vector o una célula de acuerdo con la presente invención para la expresión de una proteína, péptido o ácido nucleico funcional resulta ventajoso seleccionar un promotor de AOX1 apropiado que satisfaga los requerimientos planteados para la expresión (p. ej. expresión elevada o constitutiva en condiciones de des-represión (= sin adición de glucosa al medio) o en condiciones inducidas por metanol). Los promotores de AOX1 mutantes adecuados pueden ser seleccionados con la ayuda de la tabla 2.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para el aislamiento de clones de superexpresión que comprende las etapas de:

- a) introducir una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante 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, donde dicho promotor y dicho ácido nucleico están conectados operablemente entre sí formando una casete de expresión de una sola copia o de múltiples copias 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 y una fuente de carbono no represora sin metanol para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de des-represión,
- 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 expresión elevada que albergan un vector o un ácido nucleico que comprende un promotor inducible por metanol mutado requiere métodos que permitan al experto en la técnica aislar estos clones. Semejante método se proporciona en la presente memoria. La primera etapa de dicho método es la introducción del promotor que comprende ácido nucleico (p. ej. vector) en una célula adecuada, que es capaz de regular dicho promotor. El propio promotor puede ser mutado mediante ingeniería genética o mediante mutagénesis química (p. ej. bisulfito, nitrito, ácido fumárico, hidrazina) o física (p. ej. radiación, especialmente radiación UV). En una etapa adicional las células que albergan dicho promotor mutado son transferidas a un medio, preferiblemente un medio sólido directamente o vía un medio líquido, que comprende un antibiótico (p. ej. Zeocina) y sorbitol (u otra fuente de carbono no represora como se describe, p. ej. en [12], en particular alanina, manitol o trehalosa) para el crecimiento de clones de elevada expresión en condiciones de des-represión y que comprende metanol adicional, si se deben descubrir clones de expresión elevada en condiciones inducidas. Incluyendo glucosa en el medio junto con metanol, los transformantes inducidos por glucosa no reprimida y metanol pudieron ser aislados (para evitar la volatilización de metanol el medio puede ser almacenado durante la incubación en una atmósfera saturada con metanol o que comprenda metanol). Después del cultivo de las células en o sobre un medio adecuado, dichas células se aíslan de dicho medio y se pueden utilizar para un análisis adicional (p. ej. determinación de la tasa de expresión exacta, aislamiento del promotor con el fin de analizar los cambios en la secuencia de ácido nucleico del promotor en comparación con el promotor de tipo salvaje). Las fuentes de carbono no represoras utilizadas en el método de acuerdo con la presente invención y descritas, p. ej. en [12], se emplean preferiblemente en una cantidad de 0,1 a 10%, preferiblemente en una cantidad de 0,2 a 5%, más preferiblemente en una cantidad de 0,3 a 3%, en particular en una cantidad de 0,5 a 1%. Se selecciona una fuente de carbono no represora preferida del grupo que consiste en alanina, manitol, sorbitol, trehalosa, lactosa y sus combinaciones.

La selección del gen de resistencia a un marcador adecuado depende del marcador utilizado para seleccionar los transformantes. Por ejemplo, si se utiliza Zeocina como marcador el gen de resistencia al marcador que se va a introducir en el vector bajo el control del promotor de AOX1 mutante es el gen *Sh ble*. Si el ácido nucleico codifica una proteína o un péptido, la proteína resultante/expresada puede ser una proteína de fusión. Resulta especialmente ventajoso proporcionar el gen de resistencia marcador bajo el control del promotor de AOX1 mutante, porque en semejante caso la tasa de expresión del gen de resistencia marcador depende también de la fuerza del promotor y del comportamiento del promotor mutado. Por ejemplo, un promotor fuerte responsable de la elevada expresión del producto de ácido nucleico también aumentará la tasa de expresión del producto del gen de resistencia al marcador. Tales clones tienen una ventaja selectiva sobre los clones con un promotor que muestra una fuerza del promotor reducida. Esto permite la selección de clones de superexpresión directamente después de la regeneración a partir de la transformación de las células.

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

Los promotores (transformantes) que muestran un incremento de la expresión en ausencia de fuentes de C por lo demás represoras (en el caso de la glucosa promotora del AOX1) se seleccionan mediante crecimiento selectivo de células transformadas en/sobre medio que contiene una fuente de carbono no represora. Los promotores (transformantes) que muestran un incremento de la expresión en ausencia de fuentes de C por lo demás represoras (en el caso de la glucosa promotora de AOX1) en presencia de un inductor (p. ej. metanol) se seleccionan mediante crecimiento selectivo de células transformadas en/sobre medio que contiene una fuente de carbono no represora y el inductor (p. ej. metanol). El inductor también puede ser una fuente de carbono no represora. Los clones de superexpresión se seleccionan combinando una copia múltiple que conduce a una resistencia superior frente a antibióticos (p. ej. Zeocina) o una productividad superior de un componente del medio esencial (p. ej. Leu, His, Arg, Ura) con la selección reguladora descrita más arriba.

Las composiciones de medio que se van a utilizar en un método de acuerdo con la presente invención se pueden obtener directamente de fabricantes o distribuidores de kits, células y vectores relacionados con *Pichia Pastoris* (p. ej. Invitrogen). La concentración de metanol en el medio puede ser preferiblemente de 0,05 a 15%, más preferiblemente de 0,1 a 10%, concretamente de 0,3 a 5%. En las publicaciones científicas se describen diferentes concentraciones de metanol para diferentes condiciones de cultivo. Por ejemplo, los matraces con sacudimiento pueden contener 1% de metanol o menos (Guarna MM, *et al.* (1997) *Biotech. Bioeng.* 56:279-286), los procedimientos de fermentación pueden contener 0,5% de metanol (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 intensificada de clones de múltiples copias puede depender no solamente de la presencia de más de una copia del promotor mutado en una célula si no también debido al hecho de que hay una carencia de varios factores de transcripción, debido a que estos factores pueden estar unidos al elevado número de sitios de unión al factor de transcripción en dicha célula. Esto pudo ser demostrado mediante la comparación de la tasa de expresión en condiciones de inducción con metanol con la tasa de expresión en condiciones de des-represión donde se pudo encontrar que la tasa de expresión intensificada no es sólo un efecto del número de copias del promotor de AOX1 mutado en la célula (efecto no lineal). Por ejemplo, la cepa d6*F10 muestra tales características.

El medio utilizado para aislar clones de superexpresión puede comprender componentes del medio adicionales como leucina, uracilo, arginina, histidina y/o adenina y el sorbitol puede ser cambiado por glucosa con el fin de identificar variantes del promotor que muestren una represión reducida en presencia de glucosa en comparación con las variantes de promotor de tipo salvaje.

Cuando se utilizan cepas auxotróficas, la célula puede ser transferida a un medio que comprende sorbitol (u otras fuentes de carbono no represoras) y que contiene componentes del medio individuales (p. ej. leucina, uracilo, arginina, histidina y adenina) para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de des-represión empleando marcadores de auxotrofia (etapa b)).

El marcador de resistencia P(TEF)-Zeo utilizado comúnmente en los 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 de múltiples copias mediante la resistencia a concentraciones más altas del antibiótico. El nuevo método descrito permite combinar este efecto con las características reguladoras para detectar promotores y clones de múltiples copias que conducen a una expresión superior en ciertas circunstancias reguladoras controlables (p. ej. expresión des-reprimida, expresión inducida etc.). Esto hace posible detectar nuevos promotores con propiedades reguladoras alteradas y también clones donde los clones con múltiples copias conducen a un aumento de la expresión en tales condiciones reguladoras especiales.

Los "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 salvaje o más de una proteína o ácido nucleico funcional que aplicando vectores que utilizan normalmente combinaciones de promotor-marcador de selección tales como P(TEF)-Zeo. La tasa de expresión de los "clones de superexpresión" de acuerdo con la presente invención puede ser incrementada al menos un 20%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 100%, concretamente al menos 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 salvaje (valor medio más dos a tres veces la desviación típica). Los "clones de súper-expresión" pueden comprender preferiblemente más de una copia del promotor mutado o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, los "clones de superexpresión" también pueden ser denominados "clones de expresión elevada".

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. Tales promotores son preferiblemente los promotores de AOX1 (de *Pichia pastoris*) o de MOX (de *Hansenula polymorpha*) o cualquier otro promotor inducible por metanol y reprimido por glucosa derivado de levaduras metilotróficas tales como p. ej. FMD, FLD, DAS (p. ej. véase la tabla 6, ejemplo 1).

ES 2 358 086 T3

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

El marcador selectivo que se va a utilizar en el medio depende de qué característica molecular de la célula se va a utilizar para distinguir una célula que alberga el ácido nucleico o vector que comprende un promotor de tipo salvaje o inducible por metanol de una célula que no alberga dicho ácido nucleico o vector. Los marcadores selectivos pueden ser por lo tanto antibióticos (los genes para la resistencia a antibióticos se pueden encontrar en el vector o ácido nucleico introducido en dicha célula). Para compensar la auxotrofia de ciertas cepas el marcador selectivo del medio puede ser una sustancia como 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 el vector son introducidos en la célula mediante transformación mediante métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica, preferiblemente electroporación, transformación química, fusión de protoplastos o mediante bombardeo con partículas (véase p. ej. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Editado por: Fred M. Ausubel *et al.*; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición), J. Sambrook y D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos sin estar restringida a estas. La Fig. 1 muestra la 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). La Calle 1 es X-33 (control negativo), las Calles 2-4 son X-33 GFP-Zeo cepas Mut^S A9, D2 y E2, la Calle 5 es X-33 d6*F10. Se encuentra presente una fuerte banda a 42 kDa en todos los clones GFP-Zeo.

La Fig. 2 muestra una perspectiva general de las deleciones de secuencia en la región del promotor de *AOX1* y algunos sitios de unión al factor de transcripción. Las regiones delta 1-9 fueron suprimidas mediante PCR de extensión solapante.

La Fig. 3 muestra un diagrama de barras de la intensidad de fluorescencia de las variantes del promotor de *AOX1* a microescala después de la des-represión (agotamiento del carbono). Las células se hicieron crecer sobre glucosa al 1% a microescala. Los datos representan la media \pm DT de 4 medidas independientes. RFU: unidades de fluorescencia relativa; WT: *P. pastoris* cepa GFP-Zeo D2 con GFP-Zeo bajo el control del promotor de *AOX1* de tipo salvaje; D1-D9: cepas de *P. pastoris* con constructos de delección *AOX1* Δ 1- Δ 9 delante del gen GFP-Zeo; EX: longitud de onda de excitación; EM: longitud de onda de emisión.

La Fig. 4 muestra un diagrama de barras de la intensidad de fluorescencia de variantes del promotor de *AOX1* a microescala después de la inducción con metanol. Las células se hicieron crecer sobre glucosa 1% a microescala. Los datos representan la media \pm DT de 4 medidas independientes. RFU: unidades de fluorescencia relativa; WT: *P. pastoris* cepa GFP-Zeo D2 con GFP-Zeo bajo el control del promotor de *AOX1* de tipo salvaje; D1-D9: cepas de *P. pastoris* con constructos de delección *AOX1* Δ 1- Δ 9 delante del gen GFP-Zeo; EX: longitud de onda de excitación; EM: longitud de onda de emisión.

La Fig. 5 muestra un diagrama de barras de la intensidad de fluorescencia de variantes de promotor de *AOX1* seleccionadas a microescala. Se muestran los niveles de expresión en condiciones de des-represión así como de inducción de cepas con una sola copia y cepas con múltiples copias variantes de promotor de tipo salvaje y Δ 6. Los datos representan la media \pm DT de 4 medidas independientes. WT: cepa GFP-Zeo con una sola copia con el promotor de *AOX1* de tipo salvaje (GFP-Zeo D2), D6: clon *AOX1* Δ 6* con una sola copia; WT_E2: clon GFP-Zeo con múltiples copias con el promotor de *AOX1* de tipo salvaje; D6* F10: clon *AOX1* Δ 6* con múltiples copias (X-33 d6F10).

La Fig. 6 muestra el resultado de un ensayo de gota gruesa de cepas de *P. pastoris* sobre placas de agar MD y MDM con distintas concentraciones de Zeocina[®]. Las células se hicieron crecer sobre medio BMD (1%) a una DO₅₉₅ de 1,5, se diluyeron en etapas de 10 a una tasa de dilución final de 10⁵ y se transfirieron a las placas de agar utilizando un replicador de 48 agujas. Los números de la parte superior del cuadro indican el factor de dilución que es el mismo para todas las placas. Se preparó medio MD como se ha descrito antes. Se añadió metanol a las placas de MDM-Zeo a una concentración final de aproximadamente 0,5%. Se añadió Zeocina[®] a concentraciones finales de 100, 200 y 500 μ g/ml, respectivamente. X-33: *P. pastoris* X-33, A9: *P. pastoris* GFP-Zeo Mut^S A9, D2: *P. pastoris* GFP-Zeo D2, E2: *P. pastoris* GFP-Zeo E2.

La Fig. 7 muestra el nivel de expresión de varias cepas con múltiples copias en comparación con cepas de referencia; a) actividad en condiciones de des-represión; b) actividad después de la inducción con metanol.

La Fig. 8 muestra el nivel de expresión de cepas de múltiples copias Δ 6* en condiciones de des-represión e inducidas en comparación con las cepas de referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Materiales y métodos*

a) *Kits de Preparación/Purificación de ADN*

10 Se han utilizado varios kits de preparación y purificación de ADN disponibles en el mercado de acuerdo con los manuales suministrados (véase Tabla 3).

TABLA 3

Kits de Preparación y Purificación de ADN

15

Kit	Fabricante
20 Easy-DNA [®] Kit	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
25 QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania
30 Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega GmbH, Mannheim, Alemania
35 GenElute [®] High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit Germany	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Viena, Austria
40 QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania
45 Quantum Prep [®] Freeze N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, Viena, Austria
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania

50

b) *Clonación TOPO[®]*

55 Se realizó la clonación TOPO[®] de acuerdo con los manuales suministrados (para clonar en pCR[®]4Blunt-TOPO[®] y para clonar en pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]). Siempre se utilizaron 4 µl de producto de PCR para la clonación. Se transformaron 2 y 4 µl de cada reacción de clonación en células de *E. coli* TOP10F' químicamente competentes (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con los protocolos mencionados antes.

60

c) *Transformación en E. coli*

La transformación de las reacciones de ligación y los plásmidos en *E. coli* se realizó de acuerdo con el Protocolo SEM (método simple y eficaz) [16]. Se utilizaron células *E. coli* TOP10F' químicamente competentes para la transformación.

65

ES 2 358 086 T3

d) Transformación en *Pichia pastoris*

Preparación de células de *Pichia pastoris* competentes: Se utilizó una única colonia de la cepa anfitriona de *Pichia pastoris* deseada para inocular 50 ml de YPD (glucosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer de cuello ancho con pantalla de 300 ml. Después de incubar durante la noche a 30°C, con una humedad del 60% y a 130 rpm (Pilot Shake® RC-2 TE), se utilizó un cierto volumen de este pre-cultivo para inocular 200 ml de YPD (glucosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer con cuello ancho con pantalla de 2 l a una densidad óptica de aproximadamente 0,1 a 595 nm (DO 595). El cultivo se hizo crecer en las mismas condiciones que el pre-cultivo a una densidad óptica de 1,0 a 1,5. Las células se sedimentaron a 4°C y 4000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 200 ml de agua estéril enfriada con hielo. Este procedimiento se repitió 3 veces con 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*I (50 u cada una) durante la noche en un volumen final de 300 µl. Después de la digestión con las enzimas de restricción el ADN se hizo precipitar 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 se eliminaron las sales utilizando un Filtro de Membrana MF-Millipore® (véase Tabla 12) durante aproximadamente 1-2 h. Si se utilizaba el producto de la PCR para la transformación se procesaban aproximadamente 4-5 µg de ADN como se ha descrito antes empezando en la precipitación con EtOH.

Para cada transformación se mezclaron 80 µl de las células preparadas con 10 µg de ADN como se ha descrito antes y se incubaron durante 5 minutos sobre hielo. La mezcla se transfirió a cubetas de electro-transformación enfriadas con hielo (Bio-Rad) y se pulsaron a 200 Ω, 25 µF y 2,5 kV. Se añadió inmediatamente 1 ml de sorbitol 1 M enfriado con hielo. La suspensión se transfirió a un tubo PP de 12 ml estéril (Greiner, Frickenhausen, Alemania, núm. 184261) y se incubó durante 2 horas a 30°C sin sacudimiento. Después de esta fase de regeneración se cultivaron en placa alícuotas sobre placas de selección. Para la selección de transformantes con una expresión elevada en condiciones de inducción, las células se cultivaron en placa 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 una expresión elevada en condiciones de des-represión, las células pueden ser cultivadas en placa sobre placas con sorbitol-zeo mínimo carentes de metanol. La inclusión de glucosa en placas de selección que contienen metanol permite la detección de clones de expresión no reprimidos por glucosa y sus promotores.

e) PCR de colonias

Se resuspendió una única colonia de la cepa de *Pichia* deseada en 100 µl de ddH₂O en un microtubo de 100 µl y se calentó durante 5 a 10 minutos a 95°C. Después de la centrifugación a 13.200 rpm durante 1 minuto se utilizaron 10 µl de sobrenadante como molde para la reacción de PCR. Se utilizaron 5 µl de esta primera ronda de PCR como molde para una segunda. Se utilizaron 5 µl de la segunda ronda de PCR para un gel de control. Las reacciones de PCR contenían 10 pmoles de cada cebador (AOX1_col y GFPprev), 200 µM de cada dNTP y 2,5 unidades de ADN Polimerasa Hot Star Taq® (QIAGEN) o ADN polimerasa de Taq (Promega) en condiciones de tampón de acuerdo con los manuales suministrados en un volumen final de 50 µl. Para la secuenciación se purificó el producto de la segunda PCR utilizando un Kit de Purificación por PCR QIAquick®.

TABLA 4

Programa de temperatura para la PCR de colonias

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 30 seg	1 min 30 seg	30
72°C	10 min	10 min	1

ES 2 358 086 T3

f) Aislamiento de ADN genómico de *Pichia pastoris*

La cepa de *P. pastoris* deseada se hizo crecer durante la noche en 5 ml de YPD en un tubo PP de 12 ml estéril sobre un barril de rotación a 30°C a una DO a 595 final de 5-10. Se utilizaron 1,5 ml del cultivo para el aislamiento de ADN utilizando el Easy-DNA® Kit de acuerdo con el protocolo suministrado.

g) Análisis de proteínas

La medida de la concentración de proteína en solución se ha utilizado durante mucho tiempo en bioquímica. Una de sus principales aplicaciones consiste en la normalización de una amplia variedad de métodos bioquímicos para la cantidad total de proteína como se realiza en el presente caso para las tasas de consumo de oxígeno. Las vías más comúnmente utilizadas para determinar las concentraciones de proteína son los métodos de Bradford, Lowry y BCA®. Estos métodos tienen limitaciones definidas con respecto a la sensibilidad, el intervalo dinámico y la compatibilidad con reactivos específicos. Entre estos 3 análisis, los del Bradford y Lowry son más fiables y reproducibles que el de BCA®. Por otra parte los de Lowry y Bradford poseen graves limitaciones cuando se encuentran presentes detergentes y/o agentes reductores lo que da como resultado valores del blanco elevados. De este modo el análisis BCA® es el método de elección después de la lisis química. Se determinaron las concentraciones de proteína utilizando el análisis BCA® después de la lisis celular química con Y-Per® y BSA como patrón de acuerdo con el manual de instrucciones (Pierce Biotechnology Inc.) por lo tanto solamente las etapas principales se describirán brevemente más abajo. Se centrifugaron 200 µl de los cultivos a 4.000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl Y-Per® pipeteando arriba y abajo. La suspensión se incubó en microtubos de 1,5 ml en un Termomezclador a la temperatura ambiente y a 600 rpm durante 20 minutos. Después de que los desechos celulares fueran sedimentados a 13.200 rpm y a la temperatura ambiente durante 10 minutos, el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo y almacenado a 4°C para el análisis BCA® o SDS-PAGE. Se mezclaron 25 µl de muestra en un pocillo de microplaca con 200 µl de reactivo de trabajo de BCA® (reactivo A:reactivo B = 50:1), se agitó cuidadosamente durante 30 segundos y se cubrió herméticamente con selladores de placa (Promega). Después de incubar durante 30 minutos a 37°C y enfriar a la temperatura ambiente se determinó la absorción a 562 nm utilizando un lector de placa Spectramax Plus 384. Cuando fue necesario, se diluyeron las muestras con ddH₂O antes del análisis BCA.

h) SDS-PAGE

Se prepararon muestras para SDS-PAGE mediante lisis celular química utilizando Y-Per® como reactivo como se describe en la sección anterior. Se mezclaron 10 µl de producto lisado con 10 µl de 2x SSB (tampón para muestra Sigma) y se incubaron a 95°C durante 5-10 min y se cargaron 15 µl de esta mezcla sobre gel de proteína. Se realizó la electroforesis con 180 V durante aproximadamente 1 h y se detectaron bandas de proteína utilizando tinción con azul de Coomassie®.

TABLA 5

Preparación en gel para SDS-PAGE

	<i>Gel Concentrador (4%)</i>	<i>Gel de Resolución (12%)</i>
ddH ₂ O	3,05 ml	3,35 ml
Acrilamida 30%/bis	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 10%	25 µl	50 µl

ES 2 358 086 T3

i) Análisis de glucosa

Se determinaron las concentraciones de glucosa utilizando el método de UV Hexoquinasa con Glucosa sin des-proteinización (DIPRO med Handels GmbH, Weigelsdorf, Austria, Prod. núm. D590522). Se transfirieron 50 μ l de cultivos de *Pichia* a una microplaca de PCR y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos. Se añadieron 10 μ l de sobrenadante a 190 μ l de reactivo de hexoquinasa en una microplaca UV-Star y se incubaron a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación se midió la absorción a 340 nm utilizando un lector de placa Spectramax Plus 384.

j) Ensayos de gota gruesa

Se hicieron crecer cepas de *P. pastoris* en BMD (1%) a una DO595 final de 1,5 y se diluyeron en etapas de 10 a una tasa de dilución final de 10^5 . La transferencia sobre placas de agar se realizó con un replicador de 48 agujas. Las placas se incubaron a 30°C hasta que aparecieron colonias (normalmente 2 días sobre placas MD).

k) Alineamientos de secuencia

Todos los alineamientos de secuencia se realizaron utilizando MultAlin en la página de inicio de INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Francia) (prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) [17] o con ClustalW en el European Bioinformatics Institute (EBI, www.ebi.ac.uk/clustalw) [18]. Para la comparación de secuencias con MultAlin siempre se utilizó la matriz de similitud de secuencias de ADN para la comparación.

Los genes de la ruta de utilización del metanol y la mayoría de los genes peroxisómicos están regulados de una manera similar con respecto a la represión por glucosa, la des-represión en el agotamiento de carbono y la inducción por medio de metanol. Una regulación transcripcional similar con un grupo definido de factores de transcripción (represores así como inductores) debe ser responsable de este patrón de regulación. Los sitios de unión al factor de transcripción en 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 convenientes. Se informó de que varios genes de las levaduras metilotróficas *P. pastoris*, *H. polymorpha* y *C. boidinii* estaban co-regulados y sus secuencias promotoras fueron aisladas (Tabla 6).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 358 086 T3

TABLA 6

Genes co-regulados de la ruta de utilización del metanol o genes peroxisómicos de las levaduras metilotróficas P. pastoris, H. polymorpha y C. boidinii

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Levadura	Gen	Enzima	Núm. Acceso Genbank	Publicación
<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 membrana peroxisómica	AB035096	
	<i>PMP47</i>	proteína de membrana peroxisómica	AB035097	
	<i>CTA1</i>	catalasa	AB064338	

ES 2 358 086 T3

l) Análisis del factor de transcripción

Se realizó el análisis del factor de transcripción con MatInspector Release profesional 6.1 Enero 2003 en el GenomatixSuite 1.6.1 de Genomatix Software GmbH Servers [15]. Se utilizó la secuencia PAOX1 de pPICZ B para investigar los sitios de unión al factor de transcripción empleando Matrix Family Library Version 3.1.1 Abril 2003 grupo ALL fungi.lib (www.genomatix.de).

m) Cebadores

TABLA 7

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

SEQ ID No.	Nombre	Secuencia	Tm [°C]
2	P(AOX1) forw	AAGGTACCAGATCTAACATCCAAAGACGAAAG	70
3	P(AOX1) rev	CTAGCCATGGTTGAATTCTTTCGAATAATTAGTTGTTT- TTTG	67
4	GFPZeoforw	GAAAGAATTCAACCATGGCTAGCAAAGGAG	70
5	GFPZeorev	GATGATGGTCTAGAACGTGTCAGTCCTGCTCCTC	70
6	AOX1TTrev	GACACGTTCTAGACCATCATCATCATCATTG	67
7	AOX1TTrev	ATAGCGGCCGCACAAACGAAGGTCTC	72
8	AOX1Δ1forw	CAACACCCACTTTAGGCTACTAACACCATGACTT- TATTAG	71
9	AOX1Δ1rev	GTTAGTAGCCTAAAGTGGGTGTTGAGGAGAAGAG	70
10	AOX12forw	G TTCATGTTTGTAGATGAGGGCTTTCTGAGTG	67
11	AOX1Δ2rev	GCCCTCATCTACAAACATGAACCTCGCCAG	71

ES 2 358 086 T3

SEQ ID No.	Nombre	Secuencia	Tm [°C]	
5	12	AOX1Δ3forw	GAGGGCTTTCCCAAATGGCCCAAAACTG	70
10	13	AOX1Δ3rev	CCATTTGGGAAAGCCCTCATCTGGAGTG	70
	14	AOX1Δ4forw	CGGCCAGTTGTTGGTATTGATTGACGAATGC	69
15	15	AOX1Δ4rev	CAATACCAACAACCTGGCCGTTAGCATTTTC	71
	16	AOX1Δ5forw	GCTTCTGAACCTTGTCTCCACATTGTATGCTTC	68
20	17	AOX1Δ5rev	GTGGAGACAAGGTTTCAGAAGCGATAGAGAGAC	68
	18	AOX1Δ6forw	GTCTCCACACTGCTGATAGCCTAACGTTC	66
25	19	AOX1Δ6rev	GGCTATCAGCAGTGTGGAGACAATGCATAATCATC	71
	20	AOX1Δ7forw	GGAATACTGCTCTAACCCCTACTTGACAGC	65
30	21	AOX1Δ7rev	GTAGGGGTTAGAGCAGTATCCCACCAGAATC	67
	22	AOX1Δ8forw	CTTGACAGCAAGCTGCCCTGTCTTAAACC	66
35	23	AOX1Δ8rev	GGGCAGCTTGCTGTCAAGTAGGGGTTAG	68
	24	AOX1Δ9forw	CTGTCTTAAACCTTACTGGTTCCAATTGACAAGC	68
40	25	AOX1Δ9rev	GGAACCAGTAAGGTTTAAGACAGGGCAGC	69
	26	423forw	CACTCC	87*
45	27	1372rev	GTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCT- TAAATTTATTTGC	81*
50	28	2325forw	CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTTCTAGACCAT- CATC	86*
55	29	AOX1_col	TCCAAAGACGAAAGGTTGAATG	72
60	30	GFPprev	CCGTATGTAGCATCACCTTCACC	74

* Tm calculada utilizando la ecuación 2 (kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange®)

ES 2 358 086 T3

Arginina CGA. Las mutaciones -828, +122 y +1075 fueron reparadas con el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® tras la construcción del vector pAOX. La mutación silenciosa en la posición +507 y la mutación en el poliligador no fueron cambiadas puesto que no introducían ningún codón raro.

- 5 Se construyó pAOX separando por corte el fragmento P_{AOX1}-GFP-Zeo-AOX1TT del vector pCR®4Blunt-TOPO® con *KpnI* y *NotI* e insertándolo en el vector pBlueScript® SK entre los sitios *KpnI* y *NotI*.

10 Las mutaciones encontradas en el promotor *AOX1* y la secuencia de GFP-Zeo fueron corregidas utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos). La reacción de PCR se realizó de acuerdo con el manual suministrado que contenía 100 ng de pAOX, 100 ng de cebadores mutagénicos (423dir, 1372forw y 2325dir, respectivamente) y 1 µl de combinación de múltiples enzimas QuikChange® en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 25 µl en un termociclador durante 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 DpnI y la transformación química en células *E. coli* XL10-GOLD® (Invitrogen Corp.) se realizaron de acuerdo con el manual
15 suministrado. La corrección de las 3 mutaciones se verificó mediante secuenciación.

Ejemplo 1.2

20 *Construcción de deleciones del promotor de AOX1*

Se sintetizaron los brazos izquierdos del promotor de *AOX1* utilizando P(AOX1)forw como cebador directo y AOX n rev (n=1...9) como cebadores inversos. Los brazos derechos se sintetizaron con 10 pmoles de AOX n forw (n=1...9) como cebadores directos y P(AOX1)rev como cebador inverso. Todos los brazos se sintetizaron utilizando 12 ng del
25 vector pAOX como molde y 10 pg de cada cebador. La reacción también contenía 10 pmoles de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 µl. 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 fueron purificados en gel de agarosa antes de su uso como molde para la PCR de extensión solapante.
30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 358 086 T3

TABLA 9

Pares de cebadores solapantes y longitud del brazo para las deleciones en el promotor

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Constructo	brazo izquierdo		brazo derecho	
	cebador interno	longitud brazo [pb]	cebador interno	longitud brazo [pb]
PAOX1Δ1	AOXΔ1 rev	184	AOXΔ1 forw	738
PAOX1Δ2	AOXΔ2 rev	315	AOXΔ2 forw	624
PAOX1Δ3	AOXΔ3 rev	374	AOXΔ3 forw	578
PAOX1Δ4	AOXΔ4 rev	519	AOXΔ4 forw	421
PAOX1Δ5	AOXΔ5 rev	636	AOXΔ5 forw	290
PAOX1Δ6	AOXΔ6 rev	708	AOXΔ6 forw	247
PAOX1Δ7	AOXΔ7 rev	742	AOXΔ7 forw	209
PAOX1Δ8	AOXΔ8 rev	794	AOXΔ8 forw	171
PAOX1Δ9	AOXΔ9 rev	833	AOXΔ9 forw	115

La reacción contenía 10 ng de cada brazo preparado como se ha descrito antes como moldes, 200 μM de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas en un volumen final de 50 μl. La PCR se realizó en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 45 s; 60°C, 45 s; 68°C, 2 min) 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 20 μl de una mezcla que contenía 10 pmoles de los cebadores externos P(AOX1)forw y P(AOX1)inv, de nuevo 200 μM de cada dNTP y 0,6 U de ADN polimerasa *Pwo* en condiciones de tampón apropiadas. La PCR se hizo continuar como se había programado después de la adición de la mezcla.

Los productos de la 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 pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (Δ1, Δ3, Δ6 y Δ9) y se secuenciaron.

Se construyeron los vectores pAOXΔ separando por corte los fragmentos P_{AOX1}Δ de los vectores TOPO[®] con *Bg*III y *Eco*RI e insertándolos en el vector pAOX entre los sitios *Bg*III y *Eco*RI en lugar del promotor de *AOX1* de tipo salvaje. Los vectores resultantes se verificaron mediante secuenciación.

Ejemplo 1.3

Transformación en Pichia pastoris y análisis de los transformantes

5 La transformación en *Pichia pastoris* se llevó a cabo como se ha descrito antes. La selección para la Integración de P_{AOX1} (o P_{AOX1}Δ)-GFP-Zeo-AOX1 TT se realizó diseminando las células de *Pichia* transformadas y regeneradas en

10 Las cepas de *Pichia pastoris* se hicieron crecer en placas de pocillos profundos que contenían 300 µl de BMD (1%) por pocillo a 28°C, 320 rpm y 80% de humedad durante 60 horas a la temperatura ambiente. Después de este momento, se tomaron 50 µl para la determinación de la fluorescencia GFP. Se realizó la inducción añadiendo 250 µl de BMM2/pocillo seguido de una incubación adicional de 72 h. Se rellenó con metanol añadiendo 50 µl de BMM10 después de 10, 24 y 48 horas. Una vez más se midió la fluorescencia GFP a las 72 horas de la inducción con metanol.

15 Análisis de la expresión de la enzima informadora. Se analizó la expresión de GFP-Zeo en *Pichia pastoris* mediante detección de la fluorescencia de GFP en el lector de placa Spectramax Gemini XS con excitación a 395 nm y emisión a 507 nm. Se diluyeron 50 µl de cultivos de *P. pastoris* cultivados en placas con pocillos profundos como se ha descrito antes 1+3 con ddH₂O en placas de microtitulación FIA. Debido a la cantidad limitada de muestra solamente se realizaron medidas individuales. Todas las medias ± desviaciones típicas dadas se calculan a partir de al menos 2

20 cultivos diferentes (pocillos).

Si la casete de integración está integrada en el locus *AOX1* sin remplazar el gen *AOX1*, la cepa de *Pichia* recombinante es capaz de crecer sobre metanol con la velocidad del tipo salvaje, mientras la sustitución del gen *AOX1* con un doble cruzamiento da como resultado una tasa de crecimiento mucho más lenta sobre metanol. Estos dos fenotipos de

25 crecimiento se denominan utilización de metanol más (Mut⁺) y utilización de metanol lenta (Mut^s), respectivamente. Para el análisis del fenotipo de utilización del metanol, se transfirieron cultivos a microescala de *Pichia pastoris* a placas de agar MM y MD utilizando un replicador de 96 agujas y se incubaron a 30°C durante 2 días. Después de 2 días aparecieron colonias en ambas placas si la cepa de *Pichia* posee fenotipo Mut⁺ mientras las cepas fenotípicas Mut^s solamente aparecieron sobre las colonias de las placas MD.

30 Se analizaron todas las cepas de *Pichia* que derivan de transformaciones de pAOX o uno de los plásmidos pAOXΔ mediante PCR de colonias y también se secuenciaron los constructos de delección para asegurar la secuencia del promotor delante del gen informador (GFP-Zeo).

Ejemplo 1.4

Evolución dirigida del promotor de AOX1

40 Si bien la mutagénesis por PCR sobre las regiones codificantes de los genes está bien desarrollada y establecida no se sabe nada de la mutagénesis en las regiones promotoras. Debido a la carencia de conocimiento se realizaron varias condiciones de mutagénesis: Para minimizar la predisposición en el espectro mutacional, se utilizaron dos polimerasas diferentes, una ADN polimerasa de Taq y la ADN polimerasa Mutazyme[®] (Stratagene Inc.). Debido al hecho de que se carece completamente del conocimiento de la frecuencia de mutación para la evolución de las secuencias promotoras,

45 se sometieron a ensayo varias frecuencias de mutación (teóricamente de 1 a ~14/kb).

Mutagénesis utilizando ADN polimerasa Hot Star Taq[®]: Se realizó una PCR mutagénica sobre la secuencia promotora en un volumen de reacción de 100 µl de acuerdo con [20]. La reacción contenía 12 ng de pAOX, 40 pmoles de cada cebador, (P(AOX1)forw y P(AOX1)inv), dNTP (dGTP 200 µM, dATP 200 µM, dTTP 1 mM, dCTP 1 mM) y 5 U

50 de ADN polimerasa Hot Star Taq[®] en condiciones de tampón apropiadas. La concentración de MgCl₂ se incrementó a 7 mM (normalmente 3 mM) para alterar 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 min a 95°C y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

55 Se realizó el kit de mutagénesis al azar GeneMorph[®] sobre la secuencia del promotor en un volumen final de 50 µl de acuerdo con el manual suministrado. Se utilizaron diferentes cantidades del vector pAOX como molde (véase la Tabla 10). Se utilizaron 12,5 pmoles de cada cebador, P(AOX1)forw y P(AOX1)rev. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador durante 30 ciclos (95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C, 1 min 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.

60

65

TABLA 10

Cantidad de molde utilizado en la reacción de PCR GeneMorph®

Núm.	frecuencia de mutación	cantidad de pAOX	mutaciones esperadas/kb
1	baja-media	12 ng	~ 3 o menor
2	media	1,2 ng	3-7
3	media-alta	120 pg	~ 7 o superior

Se realizó una primera ronda de mutagénesis con las condiciones descritas antes (Taq, 3x GeneMorph®). Para obtener una frecuencia de mutaciones mayor se utilizó la reacción GeneMorph® núm. 3 como molde para una segunda ronda de PCR. Se utilizaron Taq y GeneMorph® condiciones núm. 2 y núm. 3.

Antes de la transformación en células de *Pichia pastoris* X-33 GFP-Zeo Mut^s A9, todas las reacciones de PCR se precipitaron y se sometieron a eliminación de las sales como se ha descrito antes. Se utilizó el procedimiento de transformación y regeneración convencional. La selección de promotores inducidos en medio con glucosa se realizó diseminando alícuotas de 150 μ l de suspensión de células transformadas en placas de agar MD que contenían 100-500 μ g/ml de Zeocina® e incubación a 30°C durante 2 días.

Ejemplo 1.5

Resultados y discusión

I) *Caracterización del sistema informador*

Hasta la fecha, se encuentra en uso una gran variedad de variantes de GFP en la biología molecular. Aunque difieren solamente en unas pocas mutaciones puntuales, sus características difieren enormemente. Aparte de unas propiedades de plegamiento mejoradas, sus espectros de fluorescencia así como sus rendimientos cuánticos y por lo tanto intensidades difieren mucho. Las proteínas fluorescentes verdes pueden ser divididas en dos grupos principales, dependiendo de su máximo de excitación: variantes de GFP de tipo salvaje con un máximo de excitación a 395 nm y un máximo menor a 470 nm, y variantes de GFP desplazadas al rojo con un máximo de excitación a 480-490 nm. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, la ciclo-3-GFP pertenece al grupo de la variante de GFP de tipo salvaje con un máximo de excitación a 395 nm.

Para controlar las propiedades espectrales cuando se expresan en *Pichia pastoris* se determinaron los espectros de fluorescencia. El máximo de excitación global del ciclo-3-GFP en GFP-Zeo es de 395 nm, mientras 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 se prefiere 395 nm y se utilizó para todas las medidas adicionales.

La auto-absorción es un fenómeno muy frecuente en la espectroscopía de fluorescencia. A elevadas concentraciones de fluoróforo, los fotones emitidos en una región solapante del espectro de absorción (excitación) pueden ser absorbidos (transferencia de energía radiactiva). Se observará una intensidad de fluorescencia menor si se produjera auto-absorción (efecto de filtro interno de emisión). Esto conduce a una infra-estimación de las actividades del promotor. Sin efecto de filtro interno la intensidad de fluorescencia aumenta de una manera lineal a medida que aumenta el fluoróforo. Por consiguiente se sometieron a ensayo los volúmenes crecientes de células de *Pichia pastoris* que expresan GFP-Zeo en busca de su actividad de fluorescencia.

Hasta 3.000 RFU no fue detectable efecto de filtro interno de emisión a nivel de la célula. La auto-absorción en las células, ocasionada por la acumulación de GFP, no pudo ser evaluada. Se detectó un incremento lineal en la fluorescencia a lo largo de las 72 horas completas de la fase de inducción. Por esa razón parece que no es probable un efecto de filtro interno dentro de las células. De este modo la acumulación de GFP-Zeo dentro del núcleo no es problema para su cuantificación. No se produce efecto de filtro interno en el intervalo de actividades del promotor de una sola copia determinadas en este estudio. Debido a la carencia de auto-absorción no es probable que se produzca infra-estimación de las actividades del promotor. El efecto de filtro interno observado por otros está causado muy probablemente por el uso de una variante de GFP diferente con un desplazamiento de Stokes y por lo tanto una excitación solapante y un espectro de emisión mucho más pequeños. Se debe ser cuidadoso cuando se comparan los resultados de los experimentos de expresión de GFP. El uso de varias variantes de GFP con distintas propiedades

espectrales, pero también con usos codónicos optimizados y por lo tanto niveles de expresión bastante diferentes en los diferentes anfitriones, complica la comparabilidad de los resultados de diferentes laboratorios.

5 II) *Actividad del promotor de AOX1 a micro-escala*

Se realiza normalmente un cultivo a pequeña escala de células microbianas (p. ej. levadura, bacteria) en cultivos en matraz con sacudimiento. La inoculación y cultivo de grandes genotecas microbianas en matraces con sacudimiento son laboriosos y consumen mucho tiempo, dando como resultado unos costes elevados. En los últimos años se han desarrollado sistemas de cultivo a micro-escala utilizando placas de microtitulación con pocillos profundos como alternativa. Debido a la manipulación paralela p. ej. de 96 o 384 cepas/cultivos y al menor material necesario, los sistemas de microtitulación son superiores a los matraces con sacudimiento en términos de trabajo, tiempo y por lo tanto intensidad de los costes. Debido a varias razones, las principales desventajas de los sistemas de microtitulación, el pequeño volumen de las muestras y la baja eficacia de aireación, son menos relevantes: (1) los avances técnicos en los sistemas analíticos conducen a límites de detección inferiores de un gran número de compuestos que dan como resultado la necesidad de volúmenes de muestra muy pequeños; (2) los métodos y dispositivos para el crecimiento en placas de microtitulación de pocillos profundos también se mejoraron. Se ha demostrado en algunos estudios que las tasas de aireación y por lo tanto las condiciones de crecimiento en las placas de microtitulación son similares a las de los matraces con sacudimiento. También se ha demostrado que en estudios en tiempo real con el promotor de *GALI* en *S. cerevisiae* utilizando ciclo-3-GFP como proteína informadora coinciden con los estudios en matraces con sacudimiento.

La expresión de GFP-Zeo conducida por el promotor de *AOX1* se estudió en placas de microtitulación de pocillos profundos como se ha descrito antes. Después del crecimiento celular sobre glucosa sigue una fase de inducción con metanol como fuente de carbono y energía. La inducción del promotor de *AOX1* con metanol en células de *Pichia pastoris* que poseen la casete de expresión PAOX1-GFP-Zeo-AOX1 TT condujo a un rápido incremento en la fluorescencia con GFP. Hasta las 72 horas la fluorescencia por GFP aumentó de un modo lineal. La expresión de GFP-Zeo continuaría si se añadiera metanol. Si no, el metanol se agota por evaporación y el consumo en 24 horas y la expresión de GFP-Zeo disminuye hasta un nivel des-reprimido.

El incremento en la fluorescencia por GFP-Zeo también está de acuerdo con la proteína GFP-Zeo como se demostró mediante SDS-PAGE. Tras la inducción con metanol apareció una banda de proteína de aproximadamente 42 kDa que se volvió más intensa a medida que aumentó la fluorescencia. La fuerte banda a 42 kDa se encontró en todos los clones de GFP-Zeo mientras en el control negativo (X-33 tipo salvaje) no apareció banda. También en la muestra de X-33 d6*F10 después de 72 horas de inducción con metanol se encontró una fuerte banda (Fig. 1C, Calle 5). Aunque no normalizada, es evaluable una clara correlación entre las intensidades de las bandas de 42 kDa y los niveles de fluorescencia apropiados.

40 III) *Sitios de unión al factor de transcripción*

Como se ha descrito antes, las secuencias consenso para los sitios de unión de varios factores de transcripción son conocidas. El análisis de secuencia de la secuencia del promotor de *AOX1* reveló varios supuestos sitios de unión al factor de transcripción, con unas pocas dianas de especial interés. Entre el factor de choque térmico y el motivo del elemento de respuesta al estrés, se encontraron sitios de unión de unos pocos factores de transcripción conocidos generalmente por estar implicados en la regulación de la glucosa. Los sitios de unión más interesantes se resumieron en la Tabla 11 y en la Fig. 2.

50 TABLA 11

Sitios de unión al factor de transcripción (TF) encontrados en la secuencia del promotor de AOX1. Los pares de bases en mayúsculas indican la secuencia núcleo (los 4 restos consecutivos más conservados de la matriz), los pares de bases subrayados muestran un contenido de alta información (Ci>60 de un máximo de 100)

Matriz TF	Posición (5)*	Variante deleción	Similitud del núcleo	Similitud de la matriz	Secuencia	Seq ID No.
HAP1.01	52-66 (-902 a -888)		1,000	0,802	ctgtggat gtCGGAt	31

ES 2 358 086 T3

Matriz TF	Posición (5)*	Variante deleción	Similitud del núcleo	Similitud de la matriz	Secuencia	Seq ID No.
5 HSF.01	135 a 155 (-819 a -799)		1,000	0,784	<u>AGAAgag-</u> <u>gagtggag</u> gtcctg	32
10 HAP234.01	193 a 205 (-761 a -749)	Δ1	1,000	0,895	caagc <u>CCA</u> <u>Ataac</u>	33
15 HAP234.01	203 a 215 (-751 a -739)	Δ1	1,000	0,923	gagct <u>CCA</u> <u>Atcaa</u>	34
20 ABAA.01	213 a 227 (-741 a -727)	Δ1	1,000	0,949	ctcgc <u>tCA</u> <u>TTccaat</u>	35
25 STRE.01	279 a 287 (-675 a -667)		1,000	1,000	cc <u>AGGGgg</u> g	36
30 RAP1.01	332 a 346 (-622 a -608)	Δ2	1,000	0,845	ta- c <u>ACCCgaa</u> catca	37
35 ADR1.01	371 a 377 (-583 a -577)	Δ3	1,000	1,000	t <u>GGGGtc</u>	38
40 HSF.03	516 a 536 (-438 a -418)	Δ4	1,000	0,862	<u>AGAAactt</u> <u>cmetaagt</u> cggc	39
45 HAP234.01	665 a 677 (-289 a -277)	Δ5	1,000	0,883	atcat <u>C-</u> <u>CAAaaag</u>	40
50 MAT1MC.01	680 a 690 (-274 a -264)		1,000	0,901	tgc <u>ATTGT</u> ctc	41
55						
60						

65

ES 2 358 086 T3

Matriz TF	Posición (5)*	Variante deleción	Similitud del núcleo	Similitud de la matriz	Secuencia	Seq ID No.
5 GCR1.02	699 a 713 (-255 a -241)	Δ6	1,000	0,872	<u>atgCTTCc</u> aagattc	42
10 QA-1F.01	743 a 763 (-211 a -191)	Δ7	0,785	0,775	<u>acagttaa</u> atttTGAT catga	43
15 20 25	<p>* La posición dada 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 al factor de transcripción se muestran en mayúsculas</p> <p>c indica homología con la hebra complementaria</p>					

IV) Secuencias reguladoras en genes regulados por metanol

30 Se describen en la literatura varias secuencias que están implicadas en la regulación de genes inducibles por metanol. Basándose en el análisis de deleción del promotor de *AOX2* de *P. pastoris* se describieron tres regiones reguladoras, dos regiones de acción negativa (URS1 y URS2, secuencias de represión aguas arriba) y un dominio de acción positiva (UAS, secuencia de activación aguas arriba) [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].

(V) Constructos de deleción del promotor de *AOX1*

40 Basándose en el análisis del factor de transcripción y el alineamiento de secuencias múltiples se seleccionaron 9 regiones promotoras para la deleción mediante PCR de extensión solapante como se ha descrito antes. Los constructos de deleción del promotor de *AOX1* se clonaron en el vector pAOX para remplazar el promotor 5 de “*AOX1* de tipo salvaje” por el gen informador GFP-Zeo. Los plásmidos se linealizaron y se integraron en el genoma de *Pichia pastoris*.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 358 086 T3

TABLA 12

Secuencias suprimidas en los constructos del promotor de AOX1

Constructo	Posición*		Secuencia	Seq ID No.
	extremo 5'	extremo 3'		
PAOX1Δ1	170 - 784	235 - 719	tttgccatcgaaaaaccagcccagtta ttgggcttgattggagctcgctcattc caattccttcta	44
PAOX1Δ2	304 (-650)	350 (-604)	ttatttccgaatgcaacaagctccgca ttacacccgaacatcactcc	45
PAOX1Δ3	364 (-590)	393 (-561)	ctgagtgtgggtcaaatagtttcatg ttc	46
PAOX1Δ4	509 (-445)	551 (-403)	gtcaaaaa- gaaacttccaaaagtcggcataccggt tgtcttgt	47
PAOX1Δ5	625 (-329)	683 (-271)	ccggtgcacctgtgccgaaacg- caaatggggaaacacccgctttttgga tgattatgca	48
PAOX1Δ6	694 (-260)	723 (-231)	attgtatgcttccaa- gattctggtgggaat	49
PAOX1Δ7	729 (-225)	763 (-191)	tgatagcctaacgttcatgat- caaaatttaactgt	50
PAOX1Δ8	784 (-170)	800 (-154)	aatatataaacagaagg	51
PAOX1Δ9	823 (-131)	861 (-93)	ttttttatcatcat- tattagcttactttcataattgcg	52
* Las posiciones dadas se marcan con respecto al SEQ ID No. 1				

Se analizaron los integrantes en busca de la expresión de GFP-Zeo y en busca de la integración de la secuencia promotora correcta delante del gen GFP-Zeo como se ha descrito antes. Se analizaron los integrantes de una sola copia con mayor detalle en busca de sus niveles de expresión de GFP-Zeo en diferentes fuentes de carbono a micro-escala. En ninguno de los constructos (delección y de tipo salvaje) se pudo detectar fluorescencia por GFP mientras estuvieron presentes glucosa o glicerol en el medio (con o sin metanol). Tras el agotamiento del carbono, que representaba las condiciones de des-represión, se detectó un ligero incremento en la fluorescencia por GFP. En comparación con el tipo salvaje, algunas variantes del promotor mostraron diferencias notables (Fig. 3). Se encontró una actividad promotora significativamente inferior en 6 constructos (Δ3, Δ4, Δ5, Δ7, Δ8 y Δ9, véase la Fig. 3) en condiciones de des-represión. Δ1 poseía actividad de tipo salvaje mientras los constructos Δ2 y Δ6* produjeron una expresión de GFP-Zeo significativamente superior. El nivel de expresión del último fue notablemente superior que el del nivel de tipo salvaje.

Tras la inducción con metanol todas las variantes mostraron una actividad promotora significativamente disminuida con una única excepción: Δ1 que produjo una actividad en torno a 20% mayor en comparación con el tipo salvaje. La disminución en la actividad de todas las demás variantes es bastante significativa como se puede observar en la Fig. 4.

ES 2 358 086 T3

La actividad promotora de todas las variantes y los constructos de tipo salvaje normalizados en la actividad de tipo salvaje inducida por metanol se resume en la Tabla 13.

TABLA 13

Intensidad de fluorescencia de las variantes del promotor de AOX1 a micro-escala. Los datos representan la DT media de 4 mediciones independientes. La intensidad de fluorescencia después de 72 h de inducción con metanol del promotor WT (100%) es 987 ± 81 . No fue detectable fluorescencia mientras estuvo presente glucosa en el medio

Constructo	Intensidad de fluorescencia relativa [%]	
	Des-represión	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 el constructo Δ 8 dio como resultado una destrucción masiva del promotor con un fuerte descenso de la actividad en condiciones de des-represión e inducción de aproximadamente 90% y 80%, respectivamente. Mediante la eliminación del 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 semejante efecto fuerte sobre el nivel de expresión. Es uno de los mejores constructos de delección después de la inducción con metanol. Como se esperaba, la caja TATA tiene un fuerte impacto sobre el nivel de transcripción. En contraste el comienzo del inicio de la transcripción parece no ser tan importante como la caja TATA. Otra región en la distancia definida a la caja TATA puede actuar como inicio de la transcripción después de la delección de la original. Se puede especular sobre el efecto de esta delección sobre las diferentes fases del proceso de expresión (p. ej. inicio de la transcripción, estabilidad del ARNm, inicio de la traducción) puesto que el extremo 5' del ARNm fue cambiado mediante delección.

Solamente dos constructos, Δ 2 y Δ 6*, muestran un nivel de expresión significativamente superior después de la des-represión. Los supuestos sitios de unión al factor de transcripción de Rap1p y Gcr1p están incluidos en las secuencias suprimidas. Además, el supuesto sitio de unión al factor de transcripción de QA-1F está muy próximo a las secuencias suprimidas de Δ 6*. Notablemente, se sabe que los sitios de unión de Rap1p y Gcr1p actúan de una manera sinérgica cuando están presentes en secuencias promotoras [21]. El factor de transcripción general Rap1p tiene diversas funciones celulares (p. ej. estructura del telómero, apareamiento, traducción, glicólisis) dependientes del contexto de la secuencia de su sitio de unión y de los factores de transcripción apropiados [22-24]. Como se ha mencionado antes, Gcr1p es el principal punto de regulación y coordinación de los genes glicolíticos y es absolutamente necesario para un elevado nivel de expresión en *S. cerevisiae*. Los sitios de unión de Rap1p y Gcr1p se encuentran en íntima proximidad en la región núcleo de la secuencia activadora aguas arriba (UAS) de los genes glicolíticos y la unión de Gcr1p es aliviada flexionando en ADN mediante Rap1p. Por otra parte un sitio de unión a Rap1p adyacente no es un requerimiento absoluto para la activación de genes dependiente de Gcr1p. Parece que Gcr1p puede facilitar la unión a su sitio de unión cuando está presente un número elevado de cajas CT. Aunque se describió una clara interacción de Rap1p con Gcr1p así como de Gcr1p con Gcr1p, se sugiere que algunos otros factores interaccionan con Gcr1p y/o Rap1p modulando la actividad del complejo. Se ha logrado un amplio conocimiento del mecanismo de inducción durante las 3 últimas décadas.

La íntima proximidad esencial descrita de los sitios de unión a Gcr1p y Rap1p en las UAS funcionales descritas antes no pudo ser encontrada en la secuencia del promotor de AOX1. Por el contrario, los dos sitios de unión están a

367 pb. Entre el supuesto sitio de unión a Gcr1p, su secuencia núcleo CTTCC está presente 2 veces en la secuencia del promotor de *AOX1*, pero ninguna de ellas inmediatamente adyacente al sitio de unión a Rap1p u otro motivo CTTCC. Por lo tanto parece que no es probable una acción sinérgica de estos dos sitios de unión encontrados en muchos genes glicolíticos. Debido al hecho de que los supuestos papeles de Rap1p y Gcr1p son proteínas represoras de *AOX1* en condiciones de des-represión, es posible un nuevo modo de (inter-) acción de las dos proteínas para esta supuesta función celular novedosa.

Una implicación de la delección $\Delta 6^*$ (incluyendo el sitio de unión a Gcr1p) en la represión tras el agotamiento del carbono es enfatizada por la observación de cepas con múltiples copias con una expresión de GFP-Zeo muy elevada sin inducción por metanol. La expresión de GFP-Zeo del mejor clon de la serie $\Delta 1$ - $\Delta 9$, denominado *P. pastoris* X-33 d6*F10, se muestra en la Fig. 5. La expresión de GFP-Zeo es aproximadamente 10% superior después de la des-represión (60h a micro-escala) en esta cepa con múltiples copias $\Delta 6^*$ que en una cepa de promotor de tipo salvaje de una sola copia (X-33 GFP-Zeo D2) después de la inducción con metanol. El nivel de expresión de *P. pastoris* X-33 d6*F10 después de la inducción con metanol también es mucho mayor que el de una cepa con múltiples copias con el promotor de tipo salvaje (X-33 GFP-Zeo E2).

Las regiones promotoras *AOX1* y *DAS1* de *P. pastoris* y *MOX* de *H. polymorpha* promueven la expresión de la enzima informadora beta-galactosidasa (*lacZ* de *E. coli*) en *S. cerevisiae* [9]. El patrón de regulación de estos genes en *S. cerevisiae* es similar al de sus anfitriones naturales: la glucosa reprime la expresión del gen. En condiciones de agotamiento de carbono la expresión es ligeramente des-reprimida y el glicerol como fuente de carbono induce la expresión. Los niveles de beta-galactosidasa expresados bajo el control de las regiones reguladoras *AOX1* y *DAS1* en *S. cerevisiae* son comparables con los obtenidos con los promotores fuertes *CYC1* de *S. cerevisiae* (constitutivo) y *GAL2* (inducible) [9]. Se demostró que la expresión conducida por el promotor de *MOX* también es inducida por etanol, metanol y ácido oleico en *S. cerevisiae*. Otro descubrimiento muy importante es la implicación de Adr1p en la des-represión/inducción del promotor. Adr1p, un efector positivo de *ADH2* (alcohol deshidrogenasa 2) y algunas proteínas peroxisómicas en *S. cerevisiae* [25], también es un efector positivo del promotor de *MOX* cuando el medio carece de glucosa.

Como se ha mencionado antes el patrón de regulación de los genes *AOX1* y *MOX* es significativamente diferente en sus anfitriones naturales debido a la des-represión de *MOX* cuando está presente glicerol. La utilización de la región del promotor de *AOX1* en *H. polymorpha* reveló que el promotor de *AOX1* no está reprimido por glicerol en el anfitrión heterólogo [26]. De este modo, el promotor de *AOX1* heterólogo parece estar regulado como el promotor de *MOX* homólogo. Esto da como resultado la sugerencia de que las diferencias significativas en el patrón de regulación entre *P. pastoris* y *H. polymorpha* se deben a la respuesta transcripcional global a diferentes fuentes de carbono en estas dos levaduras. Lo que significa, que mientras la maquinaria de represión del glicerol y la glucosa son (parcialmente) idénticas en *P. pastoris*, en *H. polymorpha* (como en *S. cerevisiae*) la situación es diferente y el glicerol no utiliza la maquinaria de represión de la glucosa.

Dos de los tres supuestos sitios de unión HAP2/3/4/5 encontrados en la secuencia del promotor de *AOX1* están en el constructo de delección $\Delta 1$ y el tercero en $\Delta 5$. La delección de la secuencia de $\Delta 1$ da como resultado un incremento en la actividad del promotor tras la inducción con metanol si bien no se observó efecto sobre el nivel de promotor en des-represión. Por el contrario, la delección de $\Delta 5$ da como resultado un fuerte descenso en la actividad del promotor en condiciones de des-represión así como de inducción. En la delección $\Delta 1$ se encontró un supuesto sitio de unión a *abaA* de *Aspergillus nidulans*. El producto del gen *abaA* es un activador transcripcional que está implicado en el desarrollo de los conidióforos (aparato de reproducción asexual) en *A. nidulans* [27]. Puesto que todos los supuestos sitios de unión son posibles secuencias activadoras [27], su delección debe tener un efecto negativo sobre el nivel de expresión encontrado en el constructo $\Delta 5$. Debido al hecho de que ambas delecciones son muy largas otro sitio de unión podría ser responsable del efecto observado. El hecho de que la delección de $\Delta 1$ tenga un efecto opuesto sobre el nivel de expresión indica que uno de los supuestos sitios de unión es un motivo represor, o se encuentra presente otro sitio de unión que excede los efectos de la delección de los supuestos sitios de unión de HAP y *abaA* incrementando de ese modo el nivel de expresión.

Sin embargo, se sabe que el complejo HAP es responsable de la regulación al alza de los genes implicados en el metabolismo respiratorio y energético en *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 son reprimidos por glucosa. La represión por glucosa de la respiración está parcialmente mediada por el complejo Hap, es decir por la ausencia de Hap4p mientras esté presente glucosa. Por el contrario, la regulación dependiente de oxígeno parece estar regulada por Hap1p [28]. Los homólogos de los genes del complejo Hap fueron aislados en la levadura respiratoria *K. lactis*. Los genes implicados en la respiración son expresados constitutivamente en levaduras respiratorias, incluso en presencia de glucosa. Hasta la fecha, se ha demostrado que casi cada gen de la cadena respiratoria está regulado independientemente del complejo Hap [29]. El papel del complejo Hap parece estar en la coordinación de la asimilación del carbono y el nitrógeno, que también se ha encontrado en *S. cerevisiae* [30] y *Aspergillus nidulans* [29].

La primera etapa en la ruta de utilización del metanol, catalizada principalmente por el producto del gen de *AOX1* en *P. pastoris*, es el consumo de oxígeno. La mayoría de los genes implicados en el metabolismo de la energía y casi todos los genes que codifican las enzimas que consumen oxígeno están regulados por oxígeno, principalmente por

ES 2 358 086 T3

Hap1p y/o Hap2/3/4/5p [28]. Cuando se desarrolla sobre metanol como única fuente de energía y carbono, la ruta de utilización de metanol da como resultado la asimilación de carbono y la producción de energía. Una implicación del motivo de reconocimiento TTCAA del complejo Hap en la regulación del promotor de *AOX1* tiene un sentido intuitivo.

5 El constructo $\Delta 4$, que incluye un segundo supuesto sitio de unión a HSF, dio como resultado una disminución del 30% de la actividad del promotor después de la des-represión y la inducción. Por lo tanto HSF es un intensificador general de la expresión del gen de *AOX1* en condiciones de des-represión así como de inducción. En *S. cerevisiae* 10 varias condiciones de estrés como el choque térmico, el estrés oxidativo y el agotamiento de glucosa condujeron a la activación de HSF. También se ha demostrado que la proteína quinasa Snflp, uno de los “interruptores maestros metabólicos”, está implicada en la fosforilación y por lo tanto la activación de HSF tras el agotamiento del carbono [31]. De este modo existe una implicación de HSF en la activación total de *AOX1* tras el agotamiento de la glucosa (con o sin inducción).

15 Los estudios de expresión del promotor de *AOX1* utilizando versiones truncadas así como variantes con secuencias suprimidas se describen en la técnica anterior [32, 33].

TABLA 14

20 *Resultados de los estudios de promotores 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 de inicio 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	Delección con referencia al SEQ ID No. 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
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

ES 2 358 086 T3

El constructo Inan_BCDEF, que empieza en 153 (-801) (Tabla 14) reveló un sitio de unión de al menos una proteína activadora aguas arriba de 153 (-801). Los candidatos de este sitio de unión al activador son los sitios de unión de Hap1p (52 a 66, -902 a -888) y HSF (135 y 155, -819 a -799) en la hebra complementaria encontrada con MatInspector. El truncamiento en el sitio de restricción SacI (210-215 (-744 a -739)) dio como resultado un promotor que casi alcanzó la actividad del promotor de tipo salvaje (Geoff Lin Cereghino, Poster, Sixth Meeting on “Current Topics in Gene expression and Proteomics”, San Diego, Octubre 19-22, 2003). Para alcanzar el nivel del promotor de tipo salvaje con el constructo del promotor truncado de SacI (pHWGO, Geoff Lin Cereghino, Poster), puede estar presente un segundo sitio de unión para una proteína represora aguas arriba de 210 (-744) cuya delección tiene el mismo impacto, pero en la dirección opuesta, sobre la actividad del promotor. La localización de la proteína represora está entre 169 (-784) y 210 (-744) debido a que el constructo $\Delta 1$ (Δ 169 (-784) a 234 (-719)) contiene un sitio de unión al represor. La delección de $\Delta 1$ da como resultado un incremento del 20% de la actividad promotora (Tabla 14) que está en el intervalo de la disminución por delección del sitio de unión a la proteína activadora.

Por comparación con $\Delta 4$ (Δ 508 (-445) a 550 (-403)) la localización del sitio de unión al represor puede ser perfeccionada adicionalmente a una secuencia entre 433 (-520) y 508 (-445) debido a que la delección $\Delta 4$ incluye un factor de transcripción que actúa positivamente, HSF en 516 a 536 (-438 a -418). Si el HSF que actúa positivamente (si es HSF) está localizado en la región propuesta, se puede sugerir un efecto más fuerte del sitio de unión al represor entre 433 y 508 (-520 y -445). Si el sitio de unión para HSF está localizado en la región entre 508 y 536 (-445 y -418) otro sitio de unión al activador está localizado entre 536 y 560 (-418 y -393). Si no, es probable que sea el mismo sitio de unión. Como la variante InanABCO_F (Δ 560 a 709 (-393 a -245)) con sólo 16% de la actividad del tipo salvaje, también el constructo $\Delta 5$ (624 a 682 (-329 a -271)) da como resultado un descenso de aproximadamente 70% del nivel de tipo salvaje. Como se esperaba, la delección del fragmento Inan B a partir del promotor completo (produce InanA_CDEF) así como a partir de Inan_BCDEF (produce Inan_CDEF) da como resultado una disminución hasta 63 y 64% del fragmento más largo, respectivamente. Por el contrario, si bien la delección del fragmento C a partir del promotor completo da como resultado un incremento de aproximadamente 10% en la actividad del promotor, la delección a partir del fragmento Inan_COEF truncado conduce a una disminución de 49 al 14% (Tabla 14). La explicación es una unión sinérgica de los factores de transcripción dependiente del contexto de sus sitios de unión. Entre 713 y 760 (-241 a -194) se encuentra localizado un último sitio de unión a la proteína activadora (Geoff Lin Cereghino, Poster San Diego). De nuevo, por medio del constructo $\Delta 7$ (Δ 729 a 763, -225 a -191) la localización del activador podría ser perfeccionada aguas abajo hasta 729 (-225).

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

Los datos proporcionados revelaron la regulación orquestada del promotor de *AOX1*: son necesarios varios factores para la unión al ADN para un nivel de expresión máximo. En condiciones inductoras varios factores de transcripción que actúan en positivo (activadores) se unían al ADN mientras la mayor parte de las proteínas represoras no se unían dando como resultado un nivel de expresión elevado. Mientras estaba des-reprimido, la actividad del promotor alcanzó solamente un pequeño porcentaje (~3%) del nivel inducido. Esto se debe muy probablemente a proteínas menos activadoras y más represoras que se unen a la región promotora. En condiciones de represión se puede suponer que ningún activador y varios represores se unen al ADN con un incremento adicional de la proporción de represor/activador en condiciones de represión.

Se ha demostrado para el promotor de *ADH2* (alcohol deshidrogenasa 2) reprimido por glucosa de *S. cerevisiae* que la unión de proteínas activadoras (p. ej. Adr1p) inmediatamente adyacentes a los nucleosomas conduce a la desestabilización y por lo tanto a la transposición de la cromatina después de la des-represión. La transposición tiene lugar en la región de la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, incrementando por lo tanto su accesibilidad. Debido a la mayor accesibilidad tiene lugar la formación de un complejo de pre-iniciación estable aumentando de ese modo la actividad del promotor a un nivel basal. Entre la unión de varios factores de transcripción para intensificar la expresión conducida por P_{AOX1} , es asumible un mecanismo similar, al menos para la des-represión. Tomados todos los datos y suposiciones juntos, la regulación del promotor de *AOX1* es muy compleja y los supuestos sitios de unión de varios factores de transcripción (que actúan positivamente y negativamente) revela una maquinaria altamente coordinada que es capaz de integrar una amplia variedad de señales para la regulación del promotor de *AOX1*.

VI) Mutagénesis por PCR del promotor de *AOX1*

Se ha demostrado aquí que las mutaciones específicas en las secuencias núcleo de los sitios de unión al factor de transcripción dan como resultado alteraciones significativas de su fuerza efectora. Supuestamente unas pocas proteínas activadoras y represoras actúan sobre el promotor de *AOX1* para dar como resultado su regulación muy fuerte (casi sin actividad en glucosa, actividad muy elevada en metanol). Por lo tanto la mutagénesis al azar del promotor de *AOX1* debe dar como resultado numerosas variantes del promotor con actividades del sitio de unión al represor destruidas o reducidas. Se realizaron un grupo de reacciones de PCR con diferentes tasas de mutación. Las variantes del promotor resultantes se transformaron en *P. pastoris* cepa GFP-Zeo Mut^S A9 donde el gen de *AOX1* estaba remplazado por la cepa GFP-Zeo. La reposición del promotor de *AOX1* de tipo salvaje por variantes del promotor mutagenizado se

ES 2 358 086 T3

debe producir a una tasa concreta. El escrutinio en busca de variantes del promotor con una tasa de expresión superior cuando está presente glucosa en el medio se realizó sobre placas de agar MD-Zeo.

5 La diseminación sobre placas de agar MD que contenían 100 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina[®] dio como resultado placas con manchas con células de *Pichia pastoris* y no son evidentes colonias individuales. Parece que la presión de selección no fue suficiente para reprimir el crecimiento de la cepa de tipo salvaje. Aunque no se pudo detectar fluorescencia en *P. pastoris* cepa GFP-Zeo Mut^S A9 cuando estaba presente glucosa, unas pocas proteínas GFP-Zeo podrían ser expresadas en la célula confiriendo resistencia a Zeocina[®]. Para someter a ensayo concentraciones de Zeocina[®] más altas en busca de inhibición del crecimiento de la cepa GFP-Zeo Mut^S A9 se realizaron ensayos de gota gruesa como se ha descrito antes.

10 Como se puede observar claramente en la Fig. 6 el incremento hasta 200 $\mu\text{g/ml}$ no disminuyó la viabilidad celular (en comparación con 100 $\mu\text{g/ml}$) de las cepas de *P. pastoris* que portaban el gen GFP-Zeo bajo el control del promotor de *AOX1*, pero el incremento de hasta 500 $\mu\text{g/ml}$ si lo hizo. Se esperaba que la mutagénesis del promotor diera como resultado niveles de expresión solo ligeramente incrementados, por lo tanto una presión de selección de 500 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina[®] parece ser demasiado elevada. Finalmente se seleccionaron 350 $\mu\text{g/ml}$ para todos los demás escrutinios de las variantes del promotor por mutagénesis.

20 Debido a la muy compleja regulación transcripcional con las muchas regiones promotoras implicadas, resulta ventajoso un enfoque de mutagénesis al azar utilizando una tasa de mutación elevada.

Ejemplo 2

25 *Generación de deleciones del promotor*

Basándose en los resultados del ejemplo 1 se generó una segunda generación de variantes por deleción. En contraste con la primera serie en estos nuevos constructos por deleción solamente fueron suprimidos tramos de secuencia pequeños y específicos de los supuestos sitios de unión al factor de transcripción (5-15 pb) (Tabla 15).

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 15

Efectos de la delección de sitios de unión al factor de transcripción específicos a nivel de la expresión después de la des-represión (agotamiento de glucosa) e inducción por metanol. También se indican las mutaciones $\Delta 1$ - $\Delta 9$ así como las combinaciones de mutaciones individuales. Todos los números son referentes a las actividades del promotor en comparación con la actividad del promotor de tipo salvaje en las mismas condiciones

Delección	Bereich von Seq ID No. 1	Región	Delección (marcado en negrita, subrayado) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
Δ HapI	-900 a -896	Inan A	GCCAT <u>CCGAC</u> ATCCA	aumento de la expresión en condiciones de inducción
Δ Hsf_1	-812 a -805	Inan A	GGACC <u>TCCACTCC</u> TCTTC	generación de cepas con múltiples copias, aumento de la expresión en condiciones de inducción
$\Delta 1$	-784 a -719	Inan B	CCACT <u>TTTCCCATCGAAAACCAGCCCA</u> GTTAT <u>TTGGGCTTGATTGGA</u> GCTCGCTCA <u>TTCCAATTCCTTCTA</u> TTAGG	aumento de la expresión en condiciones de inducción
Δ Hap2345_1	-758 a -754	Inan B, $\Delta 1$	CAGTT <u>ATTGGG</u> CTTG	generación de cepas con múltiples copias
Δ Hap2345_2	-748 a -744	Inan B, $\Delta 1$	GCTTG <u>ATTGG</u> AGCTC	generación de cepas con múltiples copias
Δ abaA	-735 a -730	Inan B, $\Delta 1$	TCCGT <u>CATTC</u> CAATTC	generación de cepas con múltiples copias
Δ Stre	-673 a -669	Inan B	TGGCC <u>CCCC</u> TGGCGA	aumento de la expresión en condiciones de inducción
$\Delta 2$	-650 a -604	Inan C	TTTGT <u>TTA</u> TTTCCGA <u>ATGCAACAGCTCCGCA</u> TTAC <u>CCCGAACAT</u> - <u>CACTCC</u> AGATG	expresión superior en condiciones de des-represión
Δ RapI	-619 a -615	Inan C, $\Delta 2$	ATTAC <u>ACCC</u> AAACAT	generación de cepas con múltiples copias
$\Delta 3$	-590 a -561	Inan C	GCCTTCTGAGTGGGGTCAAAATAGTTTCATGTTCCCAA	
Δ AdrI	-583 a -577	Inan C, $\Delta 3$	GAGTGTGGGGTCAAAATA	generación de cepas con múltiples copias

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

Delección	Bereich von Seq ID No. 1	Región	Delección (marcado en negrita, subrayado) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
Δ4	-445 a -403	Inan D	AGTTG <u>ACAGACAACGGTATGCCGACTTTGGAGTTCTTTT</u> <u>GACT</u> TTGGT	
ΔHsf_2	-437 a -430	Inan D, Δ4	AAAAA <u>GAAACTTC</u> CAAAA	
Δ5	-329 a -271	Inan E	GAACCC <u>CGGTGCACCTGTGCCGAAACGCCAAATGGGAAACACCCGCT</u> <u>TTTGGATGATTATGCA</u> TTGTC	
ΔHap2345_3	-286 a -282	Inan E, Δ5	CGC <u>TTTTGG</u> ATGAT	generación de cepas con múltiples copias
ΔMatIMC	-271 a -267	Inan E, Δ5°	TATGC <u>ATTG</u> TCCTCCA	
Δ6	-260 a -231	Inan E & F	TCC <u>ACATTGATGCTTCC</u> AAG <u>ATCTGGTGGAA</u> ACTGCG	
	-260 a -231	Inan E &	TCC <u>ACATTGATGCTTCC</u> AAG <u>ATCTGGTGGAA</u> ACTGCG TAGCC <u>TA</u> ACGTT	expresión superior en condiciones de des-represión, generación de superclones
Δ6*	-217 a -216	F Inan F		con elevada expresión en condiciones de des-represión
ΔGer1	-252 a -248	Inan E, Δ6	GT <u>ATGCTTCC</u> AAGAT	generación de cepas con múltiples copias
Δ7	-225 a -191	Inan F	ACTGC <u>TGATAGCCTAACGTT</u> CATGATCAAA <u>ATTAACTGTCT</u> TAA	
ΔQA-IF	-207 a -193	Inan F, Δ7	TT <u>CATGATCAAAATTAACTGTCT</u> T	generación de cepas con múltiples copias, aumento de la actividad en condiciones de des-represión

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

Delección	Bereich von Seq ID No. 1	Región	Delección (marcado en negrita, subrayado) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
	-218 a -213	Inan F, Δ7	ATAGCCTAACGTT <u>CATGATCAAAAA</u> TTAACTGTTCT	aumento de actividad en condiciones de des-represión
ΔQA-11'zus	-758 a -754	Inan B, Δ1	CAGTTATGGGCTTG	generación de cepas con múltiples copias
ΔHsf_2_dHep2345_1	-437 a -430	Inan D, Δ4	AAAAAGAAACTTC AAAAA	múltiples copias
ΔHsf_2_dHep2345_1zus	-758 a -754	Inan B, Δ1	CAGTTATGGGCTTGATTTGGAGCT AAAAA GAAACTTCCAAAA	
	-747 a -745	Inan B, Δ1		
	-437 a -430	Inan D, Δ4		
	-437 a -430	Inan D, Δ4	AAAAAGAAACTTC AAAAA	generación de cepas con múltiples copias
ΔHsf_2_MatIMC	-271 a -267	Inan E, Δ5°	TATGCATTGTCTCCA	
Δ8	-170 a -154	Inan F	ACAGCAATATATAAACAGAGG AAAGCT	
Δ9	-131 a -93	Inan F	ACCTTTTTTTTATCATCATTTATAGCTTACTTTTCATAATTTGGCAC- TGG	
	-650 a -604	Inan C	TTTGTTTATTTCCGAAATGCAACAAGCTCCCGATTACACCCGAACAT- CAC TCCAGATG	generación de cepas con múltiples copias
Δ2Δ6	-260 a -231	Inan E & F	TCCACATTGTATGCTTCCAAAGATTCTGGGGAAAT ACTTGC	
Δ736-41	-218 a -213	Inan F, Δ7	ATAGCCTAACGTT CAT	

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

Delección	Bereich von Seq ID No. 1	Región	Delección (marcado en negrita, subrayado) y 5 nucleótidos adyacentes (5' y 3')	Efecto positivo
Δ737-38	-217 a -216	Inan F, Δ7	TAGCC TAACGTT	
ΔImD-d4m	-402 a -394	Inan D	CTTCTTTGGTATIGATTGA	
ΔD-44	-520 a -446	Inan D	CTTGGAAACCTAATATGACAAAAAGCGTGAICTCATCCAAGATGAAC- TAAGTTTGGTTCTGTTGAAATGCTAAACGGCCAGTTGCTTGG	
ΔI-1	-784 a -763	Inan B, Δ1	CCACTTTTGGCCATCGAAAAACCAGCCCAAGTTA	
ΔI-2	-762 a -741	Inan B, Δ1	AGCCCAGTTATTTGGGCTTIGATTGGAGCTCGCT	
ΔI-3	-740 a -719	Inan B, Δ1	GGAGCTGGCTCAATCCAAATTCCTTCTATTIAGG	
ΔI-SacI	-762 a -744	Inan B, Δ1	CCACTTTTGGCCATCGAAAAACCAGCCCAAGTTATTTGGCTTGAATTG- GAGCTC	
Ohl, et al, AOX2 UAS	-228 a -199	Inan F, Δ7	AATACTGCTGATAGCCTAACGTTCAATCAATCAAAAATAATAC	
Ohl, et al, AOX2 UAS	-369 a -337	Inan E	TAATCTCATTAAATGCTTAGCGGAGTCTCTCTATCGCTTTAATC	
Ohl, et al, AOX2 URS2	-333 a -294	Inan E	TTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGTCCGAACGCAAAATGGGGAACACC CGC	

ES 2 358 086 T3

Materiales y métodos

a) *Mutagénesis*

5 Todas las deleciones se introdujeron utilizando el protocolo de mutagénesis dirigida al sitio de dos fases de acuerdo con Wang *et al.* [34]. En una primera etapa se evaluaron dos reacciones separadas (una para el cebador directo y una para el inverso) (100 ng de molde pAOX, 15 pmoles de cebador, 200 μ M de cada uno de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 2,5 U de polimerasa *PfuU1-tra*[®] en un volumen total de 50 μ l en condiciones de tampón apropiadas). Se combinaron 25 μ l de estas dos reacciones de PCR y se realizó una segunda etapa de reacción de PCR.

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

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 358 086 T3

TABLA 16

Cebadores para la mutagénesis dirigida al sitio de deleciones del sitio de unión al factor de transcripción

Delección	Nombre	Secuencia (5' - ->3')	SEQ ID No.
Hap1	Hap1fw	GAATGAAACCTTTTTGCCATATCCA- CAGGTCCATTCTCAC	53
	Hap1rv	GAATGGACCTGTGGA- TATGGCAAAAAGGTTTCATTCAACC	54
Hsf_1	Hsf_1fw	CCGTTGCAAACGCAG- GACCTCTTCTCCTCAACACCCAC	55
	Hsf_1rv	GTGTTGAGGAGAA- GAGGTCTCGGTTTGCAACGGTCTG	56
Hap2345_1	Hap2345_1fw	CGAAAAAC- CAGCCCAGTTGCTTGATTGGAGCTCGCT	57
	Hap2345_1rv	GAGCGAGCTCCAATCAAG- CAACTGGGCTGGTTTTTCGATG	58
Hap2345_2	Hap2345_2fw	CAGCCCAGTTATTGGGCTTGAGCTCGCT CATTCCAATTC	59
	Hap2345_2rv	GGAATTGGAATGAG- CGAGCTCAAGCCCAATAACTGGGCTG	60
ABAA	ABAAfw	GGCTTGATTGGAGCTCGCTAATTCCTTC TATTAGGCTAC	61
	ABAArv	GTAGCCTAATAGAAGGAATTAG- CGAGCTCCAATCAAGCC	62
Stre_1	Stre_1fw	GCCTGTCTATCCTGGCCGGCGAGGTTCA TGTTTGTTTATTC	63
	Stre_1rv	CAAACATGAACCTCGCCGGCCAGGATA- GACAGGCTAATAAAG	64

ES 2 358 086 T3

Delección	Nombre	Secuencia (5' - ->3')	SEQ ID No.	
5	Rap1	Rap1fw	GCAACAAGCTCCGCATTACAACAT- CACTCCAGATGAGG	65
		Rap1rv	CCTCATCTGGAGTGATGTTGTAATGCGG AGCTTGTTGC	66
10	Adr1	Adr1fw	CCAGAT- GAGGGCTTTCTGAGTGAAATAGTTTCAT	67
		Adr1rv	GGGAACATGAAACTATTTCACTCA- GAAAGCCCTCATCTGG	68
15	Hsf_2	Hsf_2fw	GCCAGTTGGTCAAAAACAAAAGTCGGCA TACCGTTTGTC	69
		Hsf_2rv	CGGTATGCCGACTTTTGTTTTTGAC- CAACTGGCCGTTAGC CAAATGGGGAAACACCCGCTTATGAT- TATGCATTGTCTCCAC	70
20	Hap2345_3	Hap2345_3fw	CAAATGGGGAAACACCCGCTTATGAT- TATGCATTGTCTCCAC	71
		Hap2345_3rv	GAGACAATGCATAAT- CATAAGCGGGTGTTCCTCCATTGCG	72
25	Mat1MC	Mat1MCfw	GCTTTTTGGATGATTATGCCTCCA- CATTGTATGCTTCCAAG	73
		Mat1MCrv	CTTGGAAGCATACAATGTGGAGG- CATAATCATCCAAAAAGC	74

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 358 086 T3

Delección	Nombre	Secuencia (5' - ->3')	SEQ ID No.	
5	Gcr1	Gcr1fw	CATTGTCTCCACATTGTATGAA- GATTCTGGTGGGAATACTGC	75
10		Gcr1rv	GTATTCCCACCAGAATCTTCATA- CAATGTGGAGACAATGC	76
15	QA-1F	QA-1Ffw	GCTGA- TAGCCTAACGTTTCATGTTCTAACCCCTA	77
20		QA-1Frv	GTCAAGTAGGGTTAGAACAT- GAACGTTAGGCTATCAGCAG	78
25	736-741	d736-41fw	GGAATACTGCTGATAGCTTCATGAT- CAAAATTTAACTGTTC	79
30		d736-41rv	GTTAAATTTTGATCATGAAGCTATCAG- CAGTATTCCCACC	80
35	737-738	d737-38fw	GGAATACTGCTGATAGCCACGTTTCAT- GATCAAAATTTAACTG	81
40		d737-38rv	GTTAAATTTTGATCAT- GAACGTTGGCTATCAGCAGTATTCC	82

45

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

50 Se prepararon los plásmidos construidos como se ha descrito antes y se transformaron en *Pichia pastoris* como se describe en el ejemplo 1.

Resultados y Discusión

55

Se observa un fuerte efecto sobre el nivel de expresión con las mutaciones cortas del ejemplo 2 ya descrito para las delecciones más grandes del ejemplo 1 donde todas las mutaciones tienen un efecto positivo o negativo significativo sobre la actividad del promotor. Las delecciones cortas de los sitios de unión al factor de transcripción específico tienen fuertes efectos sobre la actividad del promotor y proporcionan una información más precisa sobre las propiedades reguladoras de sitios reguladores individuales (p. ej. sitios de unión al factor de transcripción). Gcr1 tiene un interés especial puesto que su sitio de unión está incluido en la delección A6. La secuenciación de la región promotora de un mutante por delección pAOXΔ6 y los productos de la PCR de colonias de ADN genómico de clones de *Pichia pastoris* revelaron una delección adicional en la región promotora (Delección de los nucleótidos 737 a 738 (-217 a -216) del SEQ ID No. 1). Debido al hecho de que esta variante del promotor conduce a un aumento de actividad del promotor dando como resultado por consiguiente una tasa de expresión superior en condiciones de des-represión, la mutación adicional puede ser introducida en un promotor de acuerdo con la presente invención para incrementar la expresión de proteínas en estas condiciones.

65

ES 2 358 086 T3

La actividad promotora de los clones QA-1F con una deleción (Deleción de los nucleótidos 736 a 741 (-218 a -213) del SEQ ID No. 1) es significativamente diferente en comparación con el promotor Δ QA-1F sin esta deleción adicional: La actividad cambia de ~30% (des-represión) y ~100% (Inducción) de la actividad de tipo salvaje (AOX1 Δ QA-1F, véase la tabla 15) a ~140% y ~70%, respectivamente (AOX1 Δ QA-1F_{zus}, véase la tabla 15). La deleción adicional de estos 6 nucleótidos parece tener una influencia espectacular sobre la actividad promotora. De este modo se introdujo una nueva variante de promotor que portaba esta mutación (Δ 736-741) por medio del protocolo de mutagénesis dirigida al sitio como se ha descrito antes. Ambas mutaciones que surgieron dos veces accidentalmente e independientemente en esta región dieron como resultado un incremento de la actividad promotora en condiciones de des-represión. Resulta notable que hay un incremento en la actividad del promotor aunque en ambos constructos haya e influya muy probablemente negativamente una segunda mutación.

Se generó una combinación de Δ 2 y Δ 6 (Δ 2 Δ 6) similar a las deleciones individuales por PCR de extensión solapante. Se demuestra claramente en la tabla 17 que una deleción de ambos fragmentos da como resultado un descenso muy fuerte de la actividad del promotor con condiciones de des-represión así como de inducción. Puesto que no hay una deleción adicional TA en este constructo en comparación con el constructo Δ 6* como se ha mencionado antes, también este resultado apoya la especulación de que la mutación adicional surgida accidentalmente (Δ 737-38) es responsable del aumento de actividad del promotor después del agotamiento del carbono.

Varias deleciones dan como resultado un descenso espectacular de la actividad del promotor (p. ej. Hsf, pero también Hap1 y Hap2345_1). Estos supuestos sitios de unión son dianas estupendas para una duplicación de la secuencia que daría como resultado un incremento en la actividad del promotor.

De manera interesante, en 2 de 4 clones de la variante Δ 736-741 generada mediante mutagénesis dirigida al sitio, se encontró una nueva deleción de 9 nucleótidos (TTGGTATTG) en la posición 552 a 560 (-402 a -394). El efecto de esas deleciones se encontró en una región distinta, también se encontró en los constructos Δ Hsf_2. Dicho efecto es esperado debido a la homología de la secuencia local. De este modo las regiones adicionalmente suprimidas (Δ 552-560, Δ 737-38 y Δ 736-41) y las secuencias en íntima proximidad (5 pb aguas arriba y abajo) también son supuestos sitios de unión al factor de transcripción y por lo tanto dianas altamente interesantes para deleciones y duplicaciones. La variante por deleción Δ 736-41 da como resultado un aumento de la reducción del nivel de expresión en condiciones de inducción con metanol.

Cepas con múltiples copias

En la mayor parte de los casos la generación de cepas con múltiples copias da como resultado cepas de superexpresión de GFP-Zeo. En muchos casos estas cepas tienen niveles de expresión superiores que las cepas Δ 6*F10, principalmente en condiciones de inducción con metanol. La generación de cepas con múltiples copias fue alcanzable con varios constructos, especialmente con el constructo Δ 6*, los constructos de doble deleción Δ 2 Δ 6, incluyendo las deleciones Δ 1, Δ 2 y Δ 6* así como p. ej. Gcr1, Rap1, abaA, Hap2345_1, pero también p. ej. QA-1F, Adr1, Hsf_2_Mat1MC y Hsf_2_Hap2345_1 (véase la figura 7). En estas cepas se encuentra una tasa de expresión superior en condiciones de inducción en comparación con la cepa Δ 6*F10. Por el contrario, la cepa Δ 6*F10 fue capaz de producir más GFP-Zeo que cualquier otra cepa generada hasta ahora en condiciones de des-represión. La transformación repetida del constructo Δ 6* en *Pichia pastoris* da como resultado un elevado número de cepas con múltiples copias con actividad comparable a la de la cepa Δ 6*F10, especialmente en condiciones de des-represión (figura 8).

Utilizando constructos promotores de tipo salvaje, se observó una frecuencia mucho menor de cepas con múltiples copias (p. ej. cepa E2) que utilizando variantes del promotor. Aunque se analizaron 2-4 veces más transformantes, el nivel de expresión del mejor transformante E2 es sólo dos veces más alto que los transformantes con una sola copia. En conclusión, la transformación de las variantes del promotor da como resultado una frecuencia superior de cepas de múltiples copias y estas cepas son mucho más productivas que las cepas de promotor de tipo salvaje con múltiples copias.

Ejemplo 3

Proteínas informadoras alternativas

Para someter a ensayo la viabilidad de todos los resultados de GFP-Zeo para otras proteínas básicamente bien expresadas e industrialmente relevantes (p. ej. enzimas) se clonaron algunas variantes del promotor delante de tales enzimas informadoras (p. ej. PaHNL5 α y HRP).

Clonación

Se clonaron variantes del promotor en los vectores pPICZ α B-HRP-WT [35] y pGAPZ A-PaHNL5 α . Para el cambio de promotor en pPICZ α B-HRP-WT se insertó un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' del promotor mediante mutagénesis dirigida al sitio (100 ng de vector como molde, cebador NdeI-PICZdirr y NdeI-PICZrev - véase la tabla 18). El vector resultante se denominó pPICZ α B-NdeI-HRP-WT.

ES 2 358 086 T3

TABLA 18

Cebador para la mutagénesis dirigida para la inducción de un sitio de restricción NdeI en pPICZαB-HRP-WT y para el cambio de promotor

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia (5' - ->3')	Seq ID No.
NdeI PICZfor	GAGATCAGATCTAACATATGCCAAAGACGAAAG- GTTG	83
NdeI PICZrev	CAACCTTTCGTCTTTGGCATATGTTA- GATCTGATCTC	84
AOX1NDE1	AAACATATGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGG	85
AOX1rev	TGGTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTG	86

30

35

Para el clon de expresión pGAPZ A-*PaHNL5α* se clonó primero 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 pGAPZ A-*PaHNL5α*. La clonación de las variantes del promotor en pGAPZ A-*PaHNL5α* se pudo realizar directamente después de la digestión con *EcoRI/BglIII* de los plásmidos pGAPZ A-*PaHNL5α* pAOXA. Para un cambio en pPICZαB-NdeI-HRP-WT se amplificaron las variantes del promotor mediante PCR utilizando los cebadores AOX1NDE1 y AOX1rev (véase la tabla 18, 10 ng de pAOXAΔ, 10 pmoles de cebador AOX1NDE1 y AOX1rev, 200 μM de cada dNTP, 0,6 u de Polimerasa Phusion® en condiciones de tampón apropiadas y un volumen total de 50 μl). Los productos de la PCR y el plásmido pPICZαB-NdeI-HRP-WT se clonaron empleando los sitios de restricción *NdeI/HindIII*.

40

Transformación, crecimiento y análisis enzimático

45

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

50

Se tomaron 50 μl (des-represión) o 10 μl (inducción) de sobrenadante de la centrifugación para el análisis HNL y 15 μl en ambas condiciones para el análisis HRP.

Análisis HRP (de acuerdo con [35])

55

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 estuvo seguida de 5 minutos a 405 nm en un lector de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

60

Análisis HNL (de acuerdo con [36])

65

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

ES 2 358 086 T3

Resultados y discusión

Los resultados utilizando las proteínas informadoras alternativas *PaHNL5 α* y HRP muestran claramente la transferibilidad de la actividad del promotor detectada utilizando GFP-Zeo (Tabla 17).

Debido a la menor sensibilidad del análisis HRP, el nivel de expresión en las condiciones de des-represión estuvo por debajo del límite de detección. De este modo la expresión de HRP no pudo ser determinada en condiciones de des-represión.

TABLA 17

Actividad promotora de diferentes variantes del promotor de *AOX1* con enzimas informadoras alternativas (entre paréntesis se indica la actividad relativa comparada con el promotor de tipo salvaje utilizado en las mismas condiciones (des-represión e inducción, respectivamente))

Promotor	GFP-Zeo		<i>PaHNL5α</i>		HRP	
	Des-repr.	Metanol	Des-repr. [mU/min]	Metanol [mU/min]	Des-repr. [mU/min]	Metanol [mU/min]
P (AOX1)	27,3	987	2,58	69,5	N.D.	20,3
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)		(100%)
P (AOX1) Δ 1	29,5	1188	2,37	100	N.D.	26,9
	(108%)	(120%)	(92%)	(144%)		(132%)
P (AOX1) Δ 2	43,0	399	n,d,	91,7	N.D.	9,6
	(157%)	(40%)		(132%)		(47%)
P (AOX1) Δ 6*	89,9	422	8,65	51,7	N.D.	17,5
	(329%)	(42%)	(335%)	(74%)		(86%)
P (AOX1) Δ 2 Δ 6	9,9	336	1,29	37,5	P.D.	9,9
	(36%)	(34%)	(50%)	(54%)		(49%)
N.D. no detectable						

Para transferir la selección de múltiples copias a los sistemas informadores alternativos, se clonaron las variantes del promotor de *AOX1* en los plásmidos HRP y *PaHNL5 α* apropiados delante del gen de resistencia a Zeocina reemplazando de ese modo el promotor TEF1.

Ejemplo 4

Proteína GFP informadora alternativa

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

Clonación

Se suprimieron los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I internos de la ciclo-3 GFP en el vector pAOX mediante mutagénesis dirigida al sitio empleando los cebadores Bam-del-f y Xho-del-f (Tabla 19) y 100 ng de vector como molde. El Fragmento de GFP se amplificó mediante PCR a partir del plásmido resultante (10 ng) empleando los cebadores GFP-Zeo forw (Seq. ID No. 4, Tabla 7, 10 pmoles) y wtGFP-XhoI-r (Tabla 19, 10 pmoles) y polimerasa Phusion® en condiciones apropiadas. El producto de la PCR resultante se pudo clonar en el vector pPICZ B empleando el corte de restricción *Eco*RI/*Xho*I y la ligación utilizando ADN ligasa de T4. El plásmido resultante se denominó pPICZ-GFP.

La clonación de todas las variantes del promotor en pPICZ-GFP se pudo realizar directamente después de la digestión con *Bg*II/*Eco*RI de los plásmidos pPICZ-GFP y pAOXΔ.

TABLA 19

Cebador para la mutagénesis dirigida al sitio de la ciclo-3-GFP en el vector pAOX y amplificación del Fragmento GFP del mismo

Nombre	Secuencia (5'→3')	Seq. ID No.
Bam-del-f	cgccacaacattgaagatggttccggttcaactagcagac-cattatc	87
Xho-del-f	ggaaacatttctcggacacaaacttgagtacaactataact-cacacaatg	88
wtGFP-XhoI-r	atctcgagttacttgtacaattcatccatgccatgtg-taatccc	89

Transformación, crecimiento y detección de GFP

Para la transformación de *Pichia pastoris* se linealizó la transformación de todos los plásmidos mediante *Bg*III. 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 cultivaron en placa sobre placas de agar YPD-Zeo que contenían 100 µg/ml de Zeocina.

El crecimiento de *Pichia pastoris*, la inducción con metanol y la medida de la fluorescencia GFP se realizaron exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1.

Resultados y discusión

De nuevo, los resultados utilizando GFP como sistema informador muestran la transferibilidad de la actividad del promotor detectada utilizando GFP-Zeo (Tabla 20).

Cepas con múltiples copias

Como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, la existencia de cepas con múltiples copias utilizando Zeocina como marcador de selección es muy común. La frecuencia de cepas de múltiples copias se pudo incrementar enormemente aumentando la concentración de Zeocina en las placas de selección hasta 500 y 1000 µg/ml, respectivamente.

ES 2 358 086 T3

TABLA 20

Actividad promotora relativa de diferentes variantes del promotor de AOX1 con GFP y GFP-Zeo como gen informador comparada con el promotor de tipo salvaje en las mismas condiciones (des-represión e inducción, respectivamente)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Variante del Promotor	GFP		GFP-Zeo	
	Cepa Núm.	RFU Metanol	Cepa Núm.	RFU 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 %

ES 2 358 086 T3

	GFP		GFP-Zeo	
Variante del Promotor	Cepa Núm.	RFU Metanol	Cepa Núm.	RFU Metanol
Δ6*	E11	23 ‰	A5	40 ‰
ΔGcr1	A9	60 ‰	A2	55 ‰
Δ7	D12	38 ‰	A7	25 ‰
ΔQA-1F	7A3	61 ‰	E2	61 ‰
ΔQA-1Fzus	7A6	15 ‰	H7	25 ‰
Δ8	E1	11 ‰	H1	17 ‰
Δ9	3E5	23 ‰	A12	61 ‰
Δ2Δ6	4B10	22 ‰	F3	21 ‰
Δ736-41	5A7	8.8 ‰	C6	6 ‰
Δ737-38	1G11	5.0 ‰	A3	8 ‰
Cepas con múltiples copias				
Δ1-3	8B10	400 ‰		
Δ6	37A3	650 ‰		

Ejemplo 5

Serie de suficiencia utilizando GFP

Para someter a ensayo pequeñas porciones del promotor de AOX1 en un sistema libre de casi todos los sitios de unión al factor de transcripción, se cortó el promotor de AOX1 unas pocas bases por delante de la caja TATA en las posiciones -176 y -194 lo que da como resultado los elementos promotores basales AOX176 y AOX194 (Tabla 21). Para permitir la posterior clonación de los elementos promotores delante de los fragmentos del promotor basal así como la clonación del promotor basal, se insertaron los sitios de restricción *Bsp*TI y *Eco*RI en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente.

ES 2 358 086 T3

TABLA 21

Secuencia de los elementos del promotor de AOX1 basales AOX176 y AOX194 y los fragmentos del promotor 737 y 201-214 que se añadirán delante de variantes del promotor basal. Los sitios de restricción BspTI y EcoRI están subrayados

5

10

15

20

25

30

35

Nombre	Secuencia (5'→3')	Seq. ID No.
AOX176	<u>CTTAAGGACAGCAATATATAAACAGGAAGCTGCCCTGTC</u> TTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATA ATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACGAC TTTTAACGACAACCTGAGAAGATCAAAAAACAATAAT- TATTGAAAGAATTC	90
AOX194	<u>CTTAAGTGTTCCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAG</u> AAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATT ATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAG CTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACCTGAGAAGATCA AAAAACAATAATTATTGAAAGAATTC	91
737	TAGCCTAACGTT	92
201- 214	CATGATCAAATTT	93

40

Clonación

Se amplificaron elementos de AOX1 basal a partir de pAOX (10 ng) utilizando los cebadores AOX1basalrev (Tabla 21, 10 pmoles) y AOXbasalforw (10 pmoles, AOX194) y AOX176fw (10 pmoles, AOX176), respectivamente. La PCR se realizó utilizando la polimerasa Phusion® (0,6 u) en condiciones apropiadas en un volumen total de 50 µl.

Se amplificó la variante del promotor AOX176-737 mediante PCR utilizando los cebadores AOX1basalrv y 737-38AOX176 como se ha descrito antes. La variante del promotor AOX176-201-214 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores AOX1basalin y 201-214AOX176 como se ha descrito antes.

50

Los productos de la PCR resultantes pudieron ser clonados en el vector pPICZ-GFP empleando el corte de restricción *Bg*III/*Eco*RI y la ligación utilizando ADN ligasa de T4 reemplazando de ese modo el promotor de *AOX1* de tipo salvaje.

55

BglIII **EspTI** **EcoRI**

 AGATCTGGAC CTAAGCAATC GTCTTACTTT CTAACTTTTC TTACCTTTTA CATTTCAGCA ATATATATAT ATATTTCAAG GATATACCGA ATTC
TCTACAGCTG AATTCGTTAG CAGAAAGAA GATTGAAAAG AATGGAAAAT GTAAGTCGT TATATATATA TATAAAGTTC CTATATGGCT TAAG

60

Los 4 oligonucleótidos Leu2basal1f, Leu2basal2f, Leu2basal1r y Leu2basal2r (25 pmoles de cada uno) se mezclaron en un volumen total de 20 µl, se calentaron a 95°C durante 2 minutos y se enfriaron hasta la temperatura ambiente lentamente. Se ligaron 3 µl de la mezcla con 159 ng de un fragmento *Bg*III/*Eco*RI de pPICZ-GFP durante 6 horas a 16°C. Después de la transformación en *E. coli* el vector resultante se denominó pLeu2basal-GFP.

65

ES 2 358 086 T3

La variante del promotor Leu2-737 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores LEU2basalrv y 737-38Leu2 y pLeu2basal-GFP como molde como se ha descrito antes. El producto de la PCR resultante se pudo clonar en el vector pPICZ-GFP empleando el corte de restricción *BglIII/EcoRI* y la ligación utilizando ADN ligasa de T4 reemplazando de ese modo el promotor de *AOX1* de tipo salvaje. El plásmido resultante se denominó pLeu2-GFP-737.

TABLA 22

Cebador para la generación de elementos del promotor basal y constructos de suficiencia

Nombre	Secuencia (5'→3')	Seq ID No.
AoX1basalrv		94
AOX176fw	TTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTGTTTTTTG TTAGATCTCGACTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAG- GAAG	95
AOX1basalfwn	TTAGATCTCGACTTAAGTGTCTAACCCCTACTTGACAG	96
737-38AOX176	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGGACAGCAATATA- TAAACAGAAGGAAG	97
201- 214AOX176	AAAGATCTCATGATCAAAATTTCTTAAGGACAGCAATA- TATAAACAGAAGGAAG	98
LEU2basal1f	GATCTCGACTTAAGCAATCGTCTTACTTTCTAACTTTTC- TTACCTTTTACATTTTCAG	99
LEU2basal2f	CAATATATATATATATATTTCAAGGATATACCG	100
LEU2basal1r	AATTCGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCT- GAAATGTAAAAG	101
LEU2basal2r	GTAAGAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTTAAGTCGA	102
LEU2basalrv	GGTTGAATTCGGTATATCCTTG	103
737-38Leu2	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGCAATCGTCTTACT- TTCTAAC	104

ES 2 358 086 T3

Transformación, crecimiento y detección de GFP

Para la transformación de *Pichia pastoris* todos los plásmidos se linealizaron mediante *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 cultivaron en placa sobre placas de agar YPD-Zeo que contenían 100 µg/ml de Zeocina.

El crecimiento de *Pichia pastoris*, la inducción con metanol y la medida de la fluorescencia de GFP se realizaron exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1.

10

Resultados y discusión

Este experimento demuestra que la adición de pequeños elementos identificados en los ejemplos 1 y 2 podría ser utilizada para incrementar la fuerza promotora de los elementos del promotor basal derivados del promotor de *AOX1* o del promotor *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

15

Cepas con Múltiples Copias

La aparición y frecuencia de cepas con múltiples copias encontradas después de la transformación es exactamente la misma que se ha descrito en el Ejemplo 4. El diferente sitio de linealización en el plásmido no tuvo ninguna influencia sobre la generación de cepas con múltiples copias.

25

TABLA 23

Actividad promotora de elementos del promotor basal sin y después de la adición de pequeños fragmentos del promotor de AOX1 que se supone que actúan como sitios de unión al regulador. Se ha utilizado GFP como proteína informadora. Se muestran las cepas con una sola copia así como con múltiples copias

30

	Una sola copia		Múltiples copias		
	RFU Des-repr.	RFU Metanol	RFU Des-repr.	RFU Metanol	
pAOX176-GFP	P.D.	22,1 ± 0,2	-	-	
pAOX194-GFP	P.D..	16,9 ± 2,9	-	-	
pAOX176-GFP-737	P.D..	21,2 ± 1,1	59 ± 6	265 ± 38	
pAOX176-GFP-201-214	69,6 ± 6,0	44,9 ± 4,8	-	-	
pLeu2basal-GFP	P.D..	11,3 ± 3,6	-	-	
pLeu2-GFP-737	P.D..	19,2 ± 1,9	55 ± 5	138 ± 11	

65

Referencias

- [1] Nakagawa, T., *et al.* (1999) *Yeast* 15(12), 1223-30.
- 5 [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.
- 10 [5] Nakagawa, T., *et al.* (2002) *Yeast* 19(12), 1067-73.
- [6] Sakai, Y., *et al.* (1998) *J. Bacteriol.* 180(22), 5885-5890.
- 15 [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.
- 20 [10] Parpinello, G., *et al.* (1998) *J. Bacteriol.* 180(11), 2958-67.
- [11] Alamae, T. *et al.* (1994) *Yeast* 10(11), 1459-66.
- 25 [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).
- 30 [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*, Nueva York, 2003.
- 35 [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.
- 40 [20] Farinas, E. T., *et al.* (2001) *Adv. Synth. Catal.* 343(6), 601-606.
- [21] Huie, M. A. *et al.* (1996) *Yeast* 12(4), 307-17.
- 45 [22] Lopez, M. C., *et al.* (1998) *PNAS U. S. A.* 95(24), 14112-7.
- [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.
- 50 [25] Simon, M., *et al.* (1992) *Yeast* 8(4), 303-9.
- [26] Raschke, W. C., *et al.* (1996) *Gene* 177(1-2), 163-7.
- 55 [27] Andrianopoulos, A. *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14(4), 2503-15.
- [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.
- 60 [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.
- 65 [32] WO 02/081650
- [33] US 6.699.691

[34] Wang, W. *et al.* (1999) *Biotechniques* 26(4), 680-2.

[35] Morawski, B., *et al.* (2000) *Protein Eng* 13(5), 377-84.

5 [36] Weis, R., *et al.* (2004) *FEMS Yeast Res.* 5, 179-189.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante del promotor de AOX1 de *Pichia pastoris* de tipo salvaje (SEQ ID No. 1) que comprende al menos una mutación en los nucleótidos 694 a 723 (-260 a -231) del Seq ID No. 1 para su expresión elevada en condiciones de des-represión en relación con el promotor de AOX1 de tipo salvaje.

10 2. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el promotor comprende adicionalmente una mutación de los nucleótidos 170 a 239 (-784 a -719) y/o los nucleótidos 729 a 763 (-225 a -191) del Seq ID No. 1 y/o de un sitio de unión al factor de transcripción (TFBS) y/o de 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), 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).

20 3. El promotor de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque la mutación es una delección, una sustitución, una inserción y/o una inversión.

25 4. El promotor de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado** porque el sitio de unión al factor de transcripción (TFBS) se selecciona del grupo que consiste en Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC, Gcr1 y QA-1F, donde el sitio de unión al factor de transcripción (TFBS) Hap1 comprende preferiblemente los nucleótidos 54 a 58 del Seq ID No. 1, Hsf los nucleótidos 142 a 149 y 517 a 524 del Seq ID No. 1, Hap234 los nucleótidos 196 a 200, 206 a 210 y 668 a 672 del Seq ID No. 1, abaA los nucleótidos 219 a 224 del Seq ID No. 1, Stre los nucleótidos 281 a 285 del Seq ID No. 1, Rap1 los nucleótidos 335 a 339 del Seq ID No. 1, Adr1 los nucleótidos 371 a 377 del Seq ID No.1, Mat1MC los nucleótidos 683 a 687 del Seq ID No. 1, Gcr1 los nucleótidos 702 a 706 del Seq ID No. 1 y QA-1F los nucleótidos 747 a 761 del Seq ID No. 1.

30 5. Una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante 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** porque dicho promotor y dicho ácido nucleico están conectados operablemente entre sí formando una casete de expresión con una única copia o múltiples copias.

35 6. Un vector que comprende un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.

40 7. Una célula que comprende al menos un promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante 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.

45 8. Una célula de acuerdo con reivindicación 7, **caracterizada** porque dicha célula es una célula eucariótica, en particular una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.

9. Un kit para la expresión de una proteína seleccionada que comprende

- 50 i) un vector de acuerdo con la reivindicación 6, y
ii) una célula capaz de expresar dicha proteína bajo el control de un promotor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

55 10. Un kit de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.

60 11. Un método para la expresión de una proteína, un péptido o un ácido nucleico funcionales en una célula que comprende las siguientes etapas:

- 65 - 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, péptido o ácido nucleico funcional, estando dicho promotor conectado operablemente a dicho ácido nucleico,
- transformar dicha célula con dicho vector o dicha molécula de ácido nucleico,

ES 2 358 086 T3

- 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. El método de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicha célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.

10

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

15

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

- a) introducir una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un promotor de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante 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 marcador, donde dicho promotor y dicho ácido nucleico están conectados operablemente entre sí formando una casete de expresión de una única copia o de múltiples copias 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 y una fuente de carbono no represora sin metanol para el crecimiento selectivo de clones de superexpresión en condiciones de des-represión,
- 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 los clones de superexpresión determinando la tasa de expresión de dicha célula.

20

25

30

35

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** porque el marcador selectivo es un antibiótico, preferiblemente Zeocina o geneticina.

40

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, **caracterizado** porque el marcador selectivo es Zeocina y el de resistencia marcador es el gen *sh ble*.

45

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque la célula es una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura metilotrófica, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*, en particular una célula de *Pichia pastoris*.

18. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, **caracterizado** porque la fuente de carbono no represora se selecciona del grupo que consiste en alanina, manitol, sorbitol, trehalosa, lactosa y sus combinaciones.

50

19. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, **caracterizado** porque la molécula de ácido nucleico o el vector son introducidos en la célula mediante transformación, preferiblemente electroporación o transformación química, o mediante fusión de protoplastos, o mediante bombardeo de partículas.

55

60

65

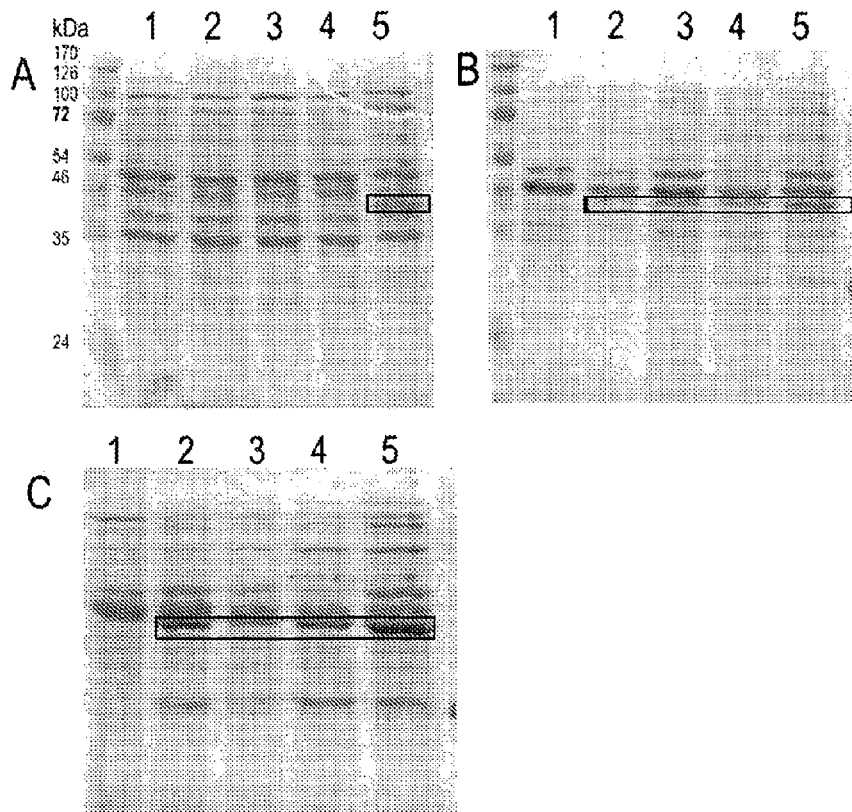


Fig. 1

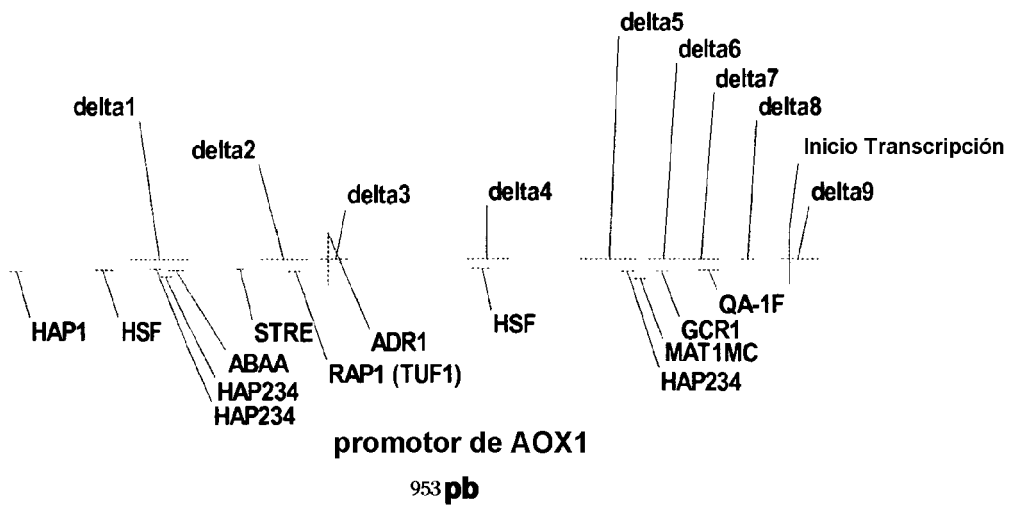


Fig. 2

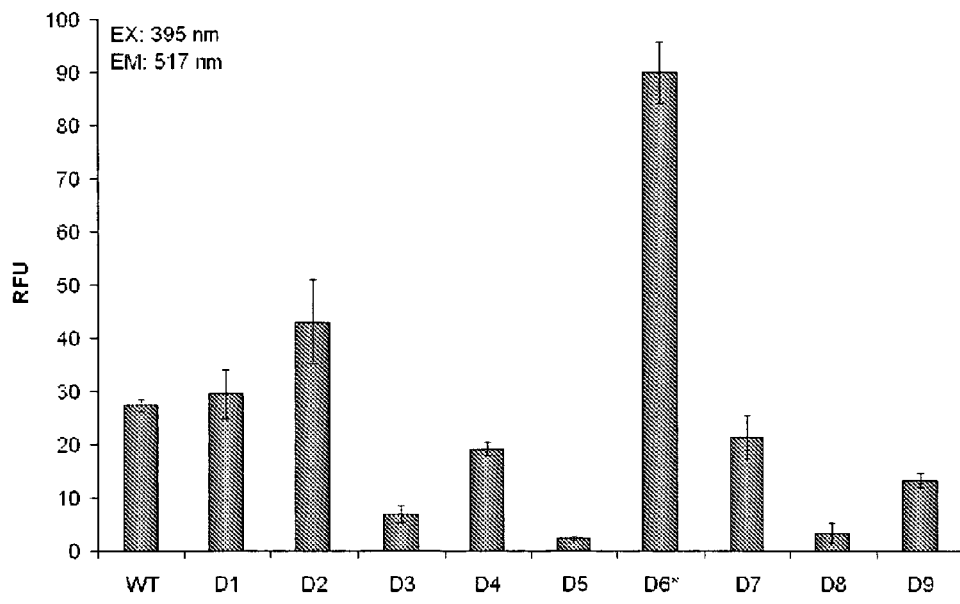


Fig. 3

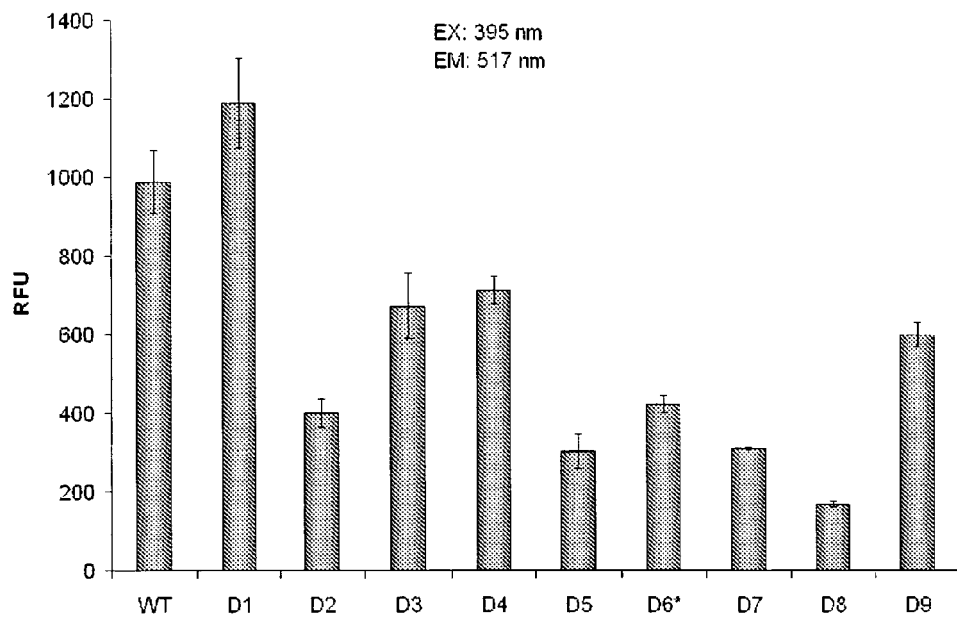


Fig. 4

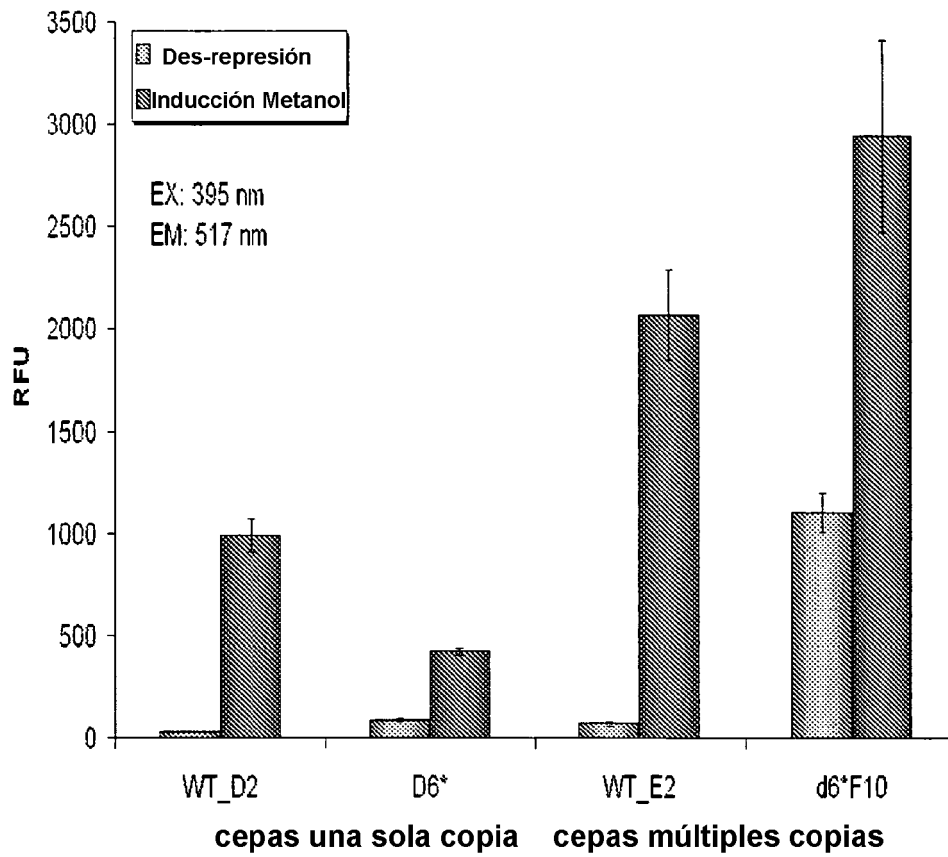


Fig. 5

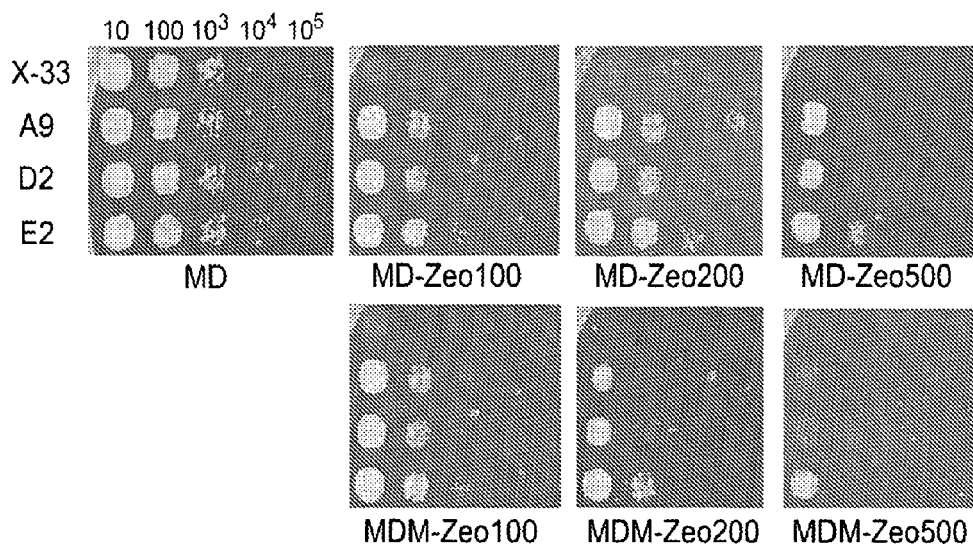


Fig. 6

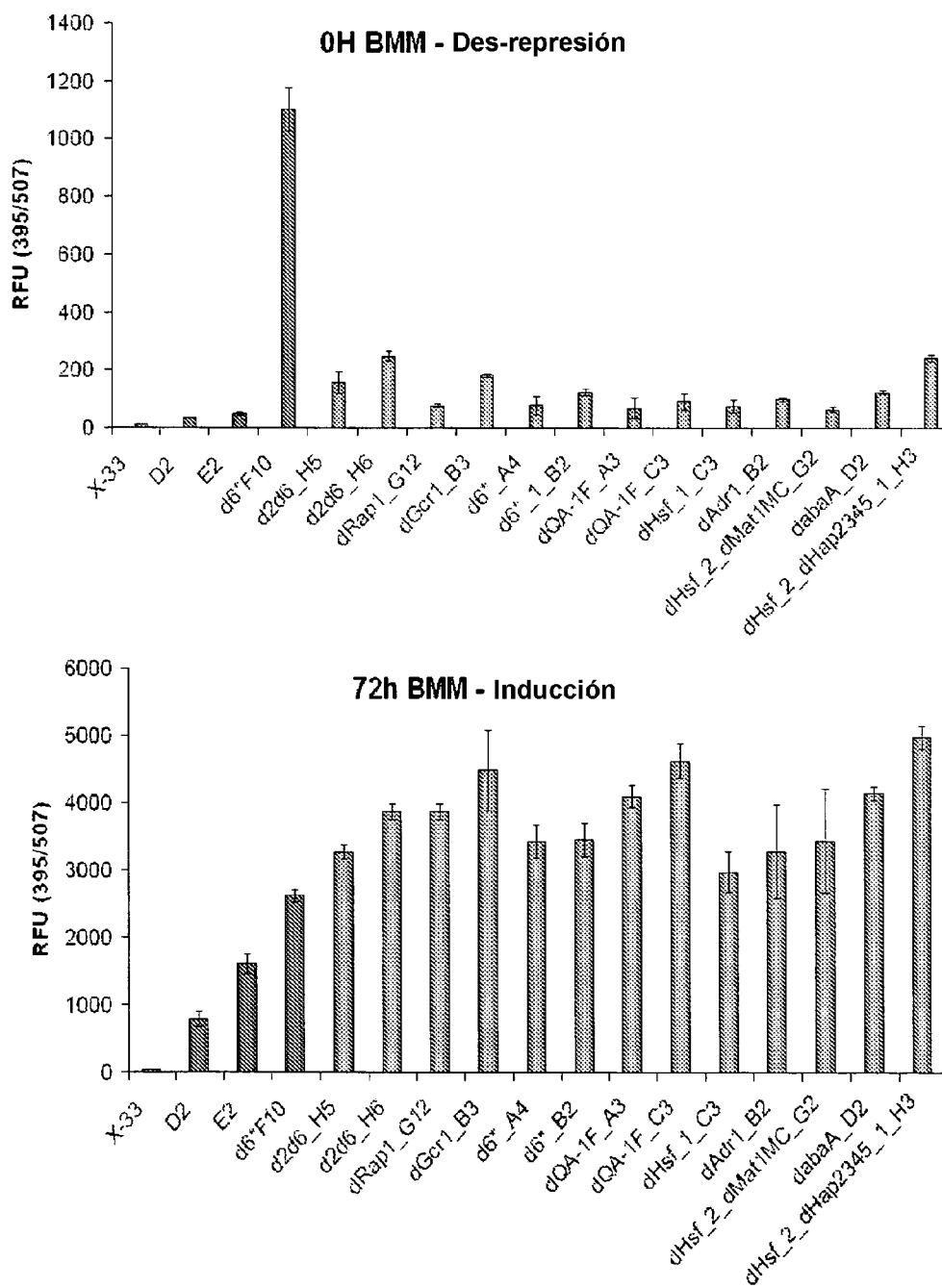


Fig. 7

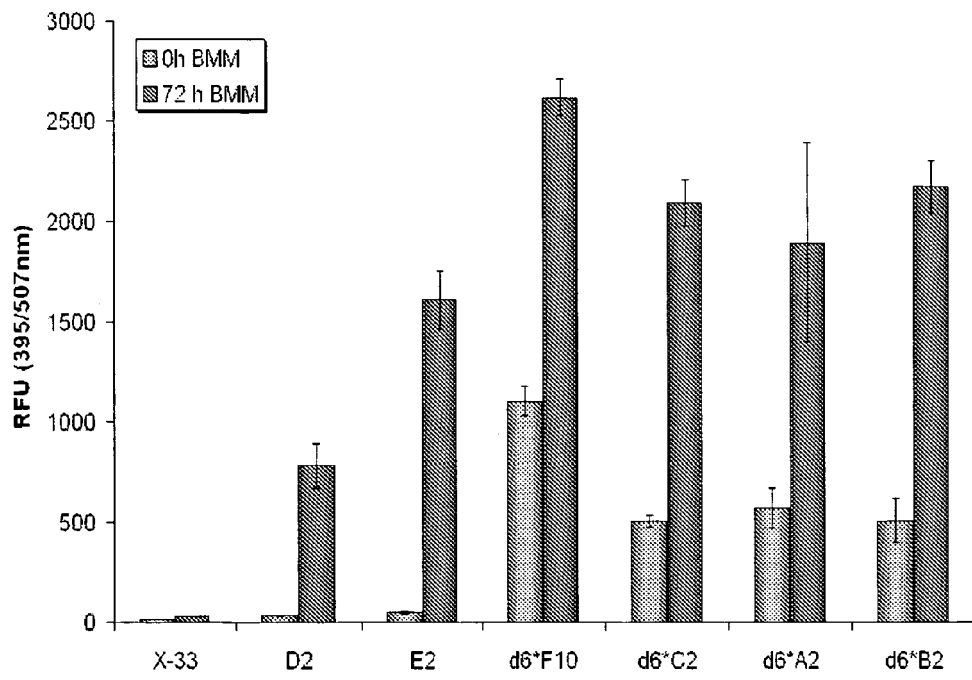


Fig. 8

ES 2 358 086 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Technische Universität Graz	
	<110> VTU Holding GMBH	
5	<120> Promotores de Aox1 mutante	
	<130> R 55445 - Solicitud Divisional de EP 06704721.7	
	<150> AT A 304/2005	
10	<151> 2005-02-23	
	<160> 137	
	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
15	<211> 953	
	<212> ADN	
	<213> <i>Pichia pastoris</i>	
20	<400> 1	
	ggtaccagat ctaacatcca aagacgaaag gttgaatgaa acctttttgc catccgacat	60
25	ccacaggtcc attctcacac ataagtgcc aacgcaacag gaggggatac actagcagca	120
	gaccgttgca aacgcaggac ctccactcct cttctcctca acaccactt ttgccatcga	180
	aaaaccagcc cagttattgg gcttgattgg agctcgctca ttccaattcc ttctattagg	240
30	ctactaacac catgacttta ttagcctgtc taccctggcc cccctggcga ggttcatggt	300
	tgtttatttc cgaatgcaac aagctccgca ttacaccgga acatcactcc agatgagggc	360
	tttctgagtg tggggtcaaa tagtttcagt ttcccaaat ggcccaaac tgacagttta	420
35	aacgctgtct tggaacctaa tatgacaaaa gcgtgatctc atccaagatg aactaagttt	480
	ggttcgttga aatgctaacg gccagttggt caaaaagaaa cttccaaaag tcggcatacc	540
	gtttgtcttg tttggtattg attgacgaat gctcaaaaat aatctcatta atgcttagcg	600
40	cagtctctct atcgcttctg aaccccggtg cacctgtgcc gaaacgcaa tggggaaaca	660
	cccgcttttt ggatgattat gcattgtctc cacattgtat gcttccaaga ttctgggtgg	720
	aatactgctg atagcctaac gttcatgatc aaaatttaac tgttctaacc cctacttgac	780
45	agcaatatat aaacagaagg aagctgcctt gtcttaaacc tttttttta tcatcattat	840
	tagcttactt tcataattgc gactggttcc aattgacaag cttttgattt taacgacttt	900
	taacgacaac ttgagaagat caaaaaacaa ctaattattg aaagaattca acc	953
50		
	<210> 2	
	<211> 32	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
60		
	<400> 2	
	aaggtaccag atctaacatc caaagacgaa ag	
65		
	<210> 3	
	<211> 42	

ES 2 358 086 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223>	
	<400> 3	
10	ctagccatgg ttgaattctt tcgaataatt agtfgttttt tg	42
	<210> 4	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223>	
	<400> 4	
25	gaaagaattc aaccatggct agcaaaggag	30
	<210> 5	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
35	<400> 5	
	gatgatggtc tagaacgtgt cagtctgct cctc	34
40	<210> 6	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<400> 6	
	gacacgttct agaccatcat catcatcadc attg	34
55	<210> 7	
	<211> 26	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
65	<400> 7	
	atagcggccg cacaaacgaa ggtctc	26

ES 2 358 086 T3

	<210> 8		
	<211> 40		
	<212> ADN		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223>		
10	<400> 8		
	caacaccac ttaggtac taacacatg actttattag		40
15	<210> 9		
	<211> 34		
	<212> ADN		
20	<213> Artificial		
	<220>		
	<223>		
25	<400> 9		
	gtagtagcc taaagtggt gtaggaga agag		34
30	<210> 10		
	<211> 32		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223>		
40	<400> 10		
	gttcattt gtagatgagg gcttctgag tg		32
45	<210> 11		
	<211> 30		
	<212> ADN		
50	<213> Artificial		
	<220>		
	<223>		
55	<400> 11		
	gccctcatc acaaacatga acctgccag		30
60	<210> 12		
	<211> 28		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		
	<220>		
	<223>		

ES 2 358 086 T3

	<400> 12	
	gagggctttc ccaaatggcc caaaactg	28
5	<210> 13	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
15	<400> 13	
	ccatttggga aagccctcat ctggagtg	28
20	<210> 14	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223>	
30	<400> 14	
	cggccagttg ttgtattga ttgacgaatg c	31
35	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223>	
45	<400> 15	
	caataccaac aactggccgt tagcatttc	29
50	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223>	
60	<400> 16	
	gcttctgaac ctgtctcca cattgtatgc ttc	33
65	<210> 17	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 17	
	gtggagacaa gggtcagaag cgatagagag ac	32
10	<210> 18	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 18	
20	gtctccacac tgctgatagc ctaacgttc	29
	<210> 19	
25	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 19	
35	ggctatcagc agtgtggaga caatgcataa tcac	35
	<210> 20	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223>	
	<400> 20	
50	ggaatactgc tctaaccct actgacagc	30
	<210> 21	
	<211> 32	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 21	
65	gtaggggta gagcagtatt cccaccagaa tc	32
	<210> 22	
	<211> 29	

ES 2 358 086 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223>	
	<400> 22	
10	cttgacagca agctgccctg tcttaaacc	29
	<210> 23	
	<211> 28	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223>	
	<400> 23	
25	gggcagcttg ctgtcaagta ggggtag	28
	<210> 24	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
35	<400> 24	
	ctgtcttaaa ccttactggt tccaattgac aagc	34
40	<210> 25	
	<211> 29	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<400> 25	
	ggaaccagta aggttaaga cagggcagc	29
55	<210> 26	
	<211> 44	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
65	<400> 26	
	gatacactag cagcagaccg ttgcaaacgc aggacctcca ctcc	44

ES 2 358 086 T3

	<210> 27	
	<211> 47	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 27	
	gtgaaggtga tgctacatac ggaaagctta cccttaaatt tatttgc	47
15	<210> 28	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223>	
25	<400> 28	
	cgtggccgag gagcaggact gacacgttct agaccatcat c	41
30	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223>	
	<400> 29	
40	tccaaagacg aaaggtgaa tg	22
	<210> 30	
45	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223>	
	<400> 30	
55	ccgtatgtag catcaccttc acc	23
	<210> 31	
	<211> 15	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223>	

ES 2 358 086 T3

	<400> 31	
	ctgtggatgt cggat	15
5	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
15	<400> 32	
	agaagaggag tggagtcct g	21
20	<210> 33	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223>	
30	<400> 33	
	caagccaat aac	13
35	<210> 34	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223>	
	<400> 34	
45	gagctccaat caa	13
	<210> 35	
50	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223>	
	<400> 35	
60	ctcgctcatt ccaat	15
	<210> 36	
	<211> 9	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 36	
	ccagggggg	9
10	<210> 37	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 37	
20	tacaccgaa catca	15
	<210> 38	
25	<211> 7	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 38	
35	tggggtc	7
	<210> 39	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223>	
	<400> 39	
50	agaaacttc aaaagtcggc	20
	<210> 40	
	<211> 13	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 40	
	atcatcaaaa aag	13
65	<210> 41	
	<211> 11	

ES 2 358 086 T3

	<210> 46	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 46	
	ctgagtgagg ggtcaaatag tttcatgttc	30
15	<210> 47	
	<211> 43	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
25	<400> 47	
	gtcaaaaaga aactccaaa agtcggcata ccgttgtct tgt	43
30	<210> 48	
	<211> 59	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
40	<400> 48	
	ccggtgcacc tgtgccgaaa cgcaaatggg gaaacaccg cttttggat gattatgca	59
45	<210> 49	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
55	<400> 49	
	attgtatgct tccaagattc tgggggaat	30
60	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	

ES 2 358 086 T3

	<400> 50	
	tgatagccta acgttcatga tcaaaattta actgt	35
5	<210> 51	
	<211> 17	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
15	<400> 51	
	aatatataaa cagaagg	17
20	<210> 52	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223>	
30	<400> 52	
	ttttttatc atcattatta gcttactttc ataattgcg	39
35	<210> 53	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223>	
	<400> 53	
45	gaatgaaacc ttttgccat atccacaggt ccattctcac	40
	<210> 54	
50	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223>	
	<400> 54	
60	gaatggacct gtggatatgg caaaaagggt tcattcaacc	40
	<210> 55	
	<211> 38	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 55	
	ccgttgcaaa cgcaggacct cttctcctca acaccac	38
10	<210> 56	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 56	
20	gtgttgagga gaagaggtcc tgcgtttgca acggtctg	38
	<210> 57	
25	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 57	
35	cgaaaaacca gccagttgc ttgattggag ctcgctcatt cc	42
	<210> 58	
40	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223>	
	<400> 58	
50	gagcgagctc caatcaagca actgggctgg ttttcgatg	40
	<210> 59	
	<211> 40	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 59	
	cagcccagtt attgggcttg agctcgctca ttccaattcc	40
65	<210> 60	
	<211> 40	

ES 2 358 086 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223>	
	<400> 60	
10	ggaattggaa tgagcgagct caagcccaat aactgggctg	40
	<210> 61	
	<211> 39	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223>	
	<400> 61	
25	ggcttgattg gagctcgcta attccttcta ttaggctac	39
	<210> 62	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
35	<400> 62	
	gtagcctaataa agaaggaatt agcgagctcc aatcaagcc	39
40	<210> 63	
	<211> 42	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<400> 63	
	gcctgtctat cctggccggc gaggttcattg tttgtttatt tc	42
55	<210> 64	
	<211> 42	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
65	<400> 64	
	caaacatgaa cctegccggc caggatagac aggctaataa ag	42

ES 2 358 086 T3

	<210> 65	
	<211> 38	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 65	
	gcaacaagct ccgcattaca acatcactcc agatgagg	38
15	<210> 66	
	<211> 38	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
25	<400> 66	
	cctcatctgg agtgatgtg taatgaggag cttgttgc	38
30	<210> 67	
	<211> 40	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
40	<400> 67	
	ccagatgagg gctttctgag tgaatatgtt tcatgtccc	40
45	<210> 68	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
55	<400> 68	
	gggaacatga aactattca ctcagaaagc cctcatctgg	40
60	<210> 69	
	<211> 39	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	

ES 2 358 086 T3

	<400> 69	
	gccagttggt caaaaacaaa agtcggcata ccgttgtc	39
5	<210> 70	
	<211> 40	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
15	<400> 70	
	cggtatccg acttttgtt ttgaccaact ggccgtagc	40
20	<210> 71	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223>	
30	<400> 71	
	caaatgggga aacaccgct tatgattatg cattgtctcc ac	42
35	<210> 72	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223>	
	<400> 72	
45	gagacaatgc ataatacataa gcgggtggtt cccattgfc g	41
50	<210> 73	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223>	
	<400> 73	
60	gcttttggga gattatgcc tccacattgt atgcttccaa g	41
65	<210> 74	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 74	
	cttggaaagca tacaatgtgg aggcataatc atccaaaaag c	41
10	<210> 75	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 75	
20	cattgtctcc acattgtatg aagattctgg tgggaatact gc	42
	<210> 76	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 76	
35	gtattcccac cagaatcttc atacaatgtg gagacaatgc	40
	<210> 77	
40	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223>	
	<400> 77	
50	gctgatagcc taacgttcat gttctaacce ctacttgaca gc	42
	<210> 78	
	<211> 41	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
60	<400> 78	
	gtcaagtagg ggtagaaca tgaacgttag gctatcagca g	41
65	<210> 79	
	<211> 41	

ES 2 358 086 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223>	
	<400> 79	
10	ggaatactgc tgatagcttc atgatcaaaa ttaactgtt c	41
	<210> 80	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223>	
	<400> 80	
25	gttaaatttt gatcatgaag ctatcagcag tattcccacc	40
	<210> 81	
	<211> 42	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
35	<400> 81	
	ggaatactgc tgatagccac gttcatgac aaaatttaac tg	42
40	<210> 82	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<400> 82	
	gttaaatttt gatcatgaac gtggctatca gcagtattcc	40
55	<210> 83	
	<211> 37	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
65	<400> 83	
	gagatcagat ctaacatag ccaaagacga aaggttg	37

ES 2 358 086 T3

	<210> 84	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 84	
	caaccttcg tctttggcat atgtagatc tgatctc	37
15	<210> 85	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223>	
25	<400> 85	
	aaacatatga gatctaacat ccaaagacga aagg	34
30	<210> 86	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223>	
	<400> 86	
40	tggtgaatt cttcaataa ttagttg	27
	<210> 87	
45	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223>	
	<400> 87	
55	cgccacaaca ttgaagatgg ttccgtcaa ctacgagacc attatc	46
	<210> 88	
	<211> 49	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223>	

ES 2 358 086 T3

<400> 88

ggaacattc tcggacaaa acttgagtac aactataact cacacaatg

49

5

<210> 89

<211> 44

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223>

15 <400> 89

atctcgagtt acttgataa ttcacccatg ccatgtgtaa tccc

44

20 <210> 90

<211> 178

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223>

30 <400> 90

c**tt**aaggaca g**ca**atatata a**ac**agaagga ag**ct**gccc**tg** t**ct**taaac**ct** t**tt**tttt**tt**at 60

c**at**cattatt ag**ct**tact**tt** c**ata**aattg**cg** a**ct**gg**tt**cc**ca** a**tt**gacaag**c** t**tt**tgatt**tt** 120

a**ac**gact**ttt** a**ac**gaca**act** t**g**agaag**atc** a**aaa**aaca**ac** t**aa**tattg**a** a**aga**att**c** 178

35

<210> 91

<211> 195

<212> ADNA

<213> Artificial

40

<220>

<223>

45

<400> 91

c**tt**aagt**gtt** c**ta**acc**cc**ta c**tt**gacag**ca** a**ta**tataa**ac** a**ga**aggaag**c** t**g**ccc**tg**t**ct** 60

t**aa**acc**ttt** t**tt**ttat**cat** c**att**attag**c** t**t**act**tt**cat a**att**g**cg**act g**gt**tt**cc**a**att** 120

g**aca**ag**ctt**t t**g**att**tt**aa**c** g**act**tt**ta**c g**aca**act**tga** g**aa**gat**caa**a a**aa**caact**aa** 180

t**t**attgaa**g** a**att**c 195

50

55 <210> 92

<211> 12

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223>

65 <400> 92

tagc**ct**aa**cg** t**t**

12

ES 2 358 086 T3

	<210> 93	
	<211> 14	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 93	
	catgatcaaa attt	14
15	<210> 94	
	<211> 32	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
25	<400> 94	
	tttgaattct ttcaataatt agttgtttt tg	32
30	<210> 95	
	<211> 43	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
40	<400> 95	
	ttagatctcg acttaaggac agcaatatat aaacagaagg aag	43
45	<210> 96	
	<211> 39	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
55	<400> 96	
	ttagatctcg acttaagtgt tctaaccctt acttgacag	39
60	<210> 97	
	<211> 52	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	

ES 2 358 086 T3

	<400> 97	
	aaagatctta gcctaacggt cctaaggaca gcaatatata aacagaagga ag	52
5	<210> 98	
	<211> 54	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
15	<400> 98	
	aaagatctca tgatcaaaat ttcttaagga cagcaatata taaacagaag gaag	54
20	<210> 99	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223>	
30	<400> 99	
	gatctcgact taagcaatcg tcttacttcc taactttct tacctttac attcag	57
35	<210> 100	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223>	
45	<400> 100	
	caatatatat atatattca aggatatacc g	31
50	<210> 101	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223>	
60	<400> 101	
	aattcggat atccttgaaa tatatatata tattgctgaa atgtaaaag	49
65	<210> 102	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 102	
	gtaagaaaag ttagaaagta agacgattgc ttaagtcga	39
10	<210> 103	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 103	
20	ggttgaattc ggtatattcct tg	22
	<210> 104	
25	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 104	
35	aaagattctta gcctaactgt ctaagcaat cgtcttactt tctaac	46
	<210> 105	
40	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223>	
	<400> 105	
50	gccatccgac atcca	15
	<210> 106	
	<211> 18	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 106	
	ggacctccac tctcttc	18
65	<210> 107	
	<211> 76	

ES 2 358 086 T3

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223>

 <400> 107
 ccacttttgc catcgaaaaa ccagcccagt tattgggctt gattggagct cgctcattcc 60
 10 aattccttct attagg 76

 <210> 108
 <211> 15
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223>

 <400> 108

 25 cagttattgg gcttg 15

 <210> 109
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223>
 35
 <400> 109

 gcttgattgg agctc 15
 40
 <210> 110
 <211> 16
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223>
 50
 <400> 110

 tcgctcattc caattc 16
 55
 <210> 111
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223>
 65 <400> 111

 tggccccctt ggcca 15

ES 2 358 086 T3

	<210> 112	
	<211> 57	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
10	<400> 112	
	ttgtttatt tccgaatgca acaagctccg cattacacc gaacatcact ccagatg	57
15	<210> 113	
	<211> 15	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
25	<400> 113	
	attacaccg aacat	15
30	<210> 114	
	<211> 40	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
40	<400> 114	
	gcttctgag tgtgggtca aatagttca tgtcccaa	40
45	<210> 115	
	<211> 17	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
55	<400> 115	
	gagtgtgggg tcaaata	17
60	<210> 116	
	<211> 53	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	

ES 2 358 086 T3

<400> 116
agttgacaag acaaacggta tgccgacttt tggaagtffc ttttgactt ggt 53

5 <210> 117
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Artificial
<220>
<223>

15 <400> 117
aaaaagaaac ttccaaaa 18

20 <210> 118
<211> 69
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223>

30 <400> 118
gaaccccggt gcacctgtgc cgaaacgcaa atggggaaac acccgctttt tggatgatta 60
tgcatgtgc 69

35 <210> 119
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
40 <220>
<223>

45 <400> 119
cgcttttgg atgat 15

50 <210> 120
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
55 <220>
<223>

60 <400> 120
tatgcattgt ctcca 15

65 <210> 121
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 358 086 T3

	<220>	
	<223>	
5	<400> 121	
	tccacattgt atgcttccaa gattctgggtg ggaataactgc	40
10	<210> 122	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223>	
	<400> 122	
20	tagcctaacg tt	12
	<210> 123	
25	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223>	
	<400> 123	
35	gtatgcttcc aagat	15
	<210> 124	
40	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223>	
	<400> 124	
50	actgctgata gcctaacgtt catgatcaaa atttaactgt tctaa	45
	<210> 125	
	<211> 25	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 125	
	ttcatgatca aaatttaact gttct	25
65	<210> 126	
	<211> 36	

ES 2 358 086 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223>	
	<400> 126	
10	atagcctaac gttcatgatc aaaatttaac tgttct	36
	<210> 127	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223>	
	<400> 127	
25	acagcaatat ataaacagaa ggaagct	27
	<210> 128	
	<211> 49	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
35	<400> 128	
	acctttttt ttatcatcat tattagctta ctttcataat tgcgactgg	49
40	<210> 129	
	<211> 16	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<400> 129	
	atagcctaac gttcat	16
55	<210> 130	
	<211> 85	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223>	
65		

ES 2 358 086 T3

	<400> 130	
	cttggAACCT aatATGACAA aagCGTgATC tCATCCAAGA tGAActAAGT ttGGtTCGtt	60
5	gAAAtGCTAA cGGCCAGttG cttGG	85
	<210> 131	
10	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223>	
	<400> 131	
20	ccacttttgc catCGAAAA ccagcccAGt ta	32
	<210> 132	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223>	
	<400> 132	
35	agcccAGtTA ttGGGcttGA ttGGAGctCG ct	32
	<210> 133	
	<211> 32	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223>	
	<400> 133	
50	ggAGctCGct cAtTCCAAtt cTtctAtTA gg	32
	<210> 134	
	<211> 51	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223>	
	<400> 134	
65	ccacttttgc catCGAAAA ccagcccAGt tAttGGGctt gAtTGGAGct c	51
	<210> 135	
	<211> 40	
	<212> ADN	

ES 2 358 086 T3

<213> Artificial
<220>
<223>
5 <400> 135
aatactgctg atagcctaac gtccatgatc aaaataatac 40
10 <210> 136
<211> 43
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223>
20 <400> 136
taatctcatt aatgcttagc gcagtctctc tategcttta atc 43
25 <210> 137
<211> 50
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223>
35 <400> 137
ttctgaaccc cggcgcacct gtcgccgaac gcaaatgggg aaacaccgc 50
40
45
50
55
60
65