



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 512**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06777773 .0**

96 Fecha de presentación : **13.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1902138**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Promotores inducibles por calor de *Tetrahymena* y su uso.**

30 Prioridad: **13.07.2005 EP 05106423**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

73 Titular/es: **CILIAN AG.**
Johann-Krane-Weg 42
48149 Münster, DE

72 Inventor/es: **Hartmann, Marcus;**
Weide, Thomas;
Herrmann, Lutz y
Niebur, Nadine

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 512 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 inducibles por calor de *Tetrahymena* y su uso

Campo de la invención

La presente invención aborda campos de la biología molecular recombinante; el tema principal son los promotores fuertes inducibles para uso en la síntesis de productos en sistemas biológicos.

Antecedentes de la invención

Tetrahymena es un organismo unicelular eucariota ciliado perteneciente al Reino Protozoa y que tiene dos núcleos, un micronúcleo de línea germinal diploide, transcripcionalmente silencioso (MIC) y un macronúcleo somático poliploide, transcripcionalmente activo (MAC). En 1923, cuando el laureado Nobel André Lwoff logró el crecimiento de *Tetrahymena* en cultivo puro, se estableció la base para explotar este Alveolata como un organismo modelo. Los descubrimientos trascendentes realizados en *Tetrahymena* son el descubrimiento de los motores de dineína, los telómeros, la catálisis mediada por ARN, la telomerasa y la función de las histona acetiltransferasas en la regulación de la transcripción. En las últimas décadas se han desarrollado técnicas de biología molecular para alterar el genoma y el proteoma de *Tetrahymena*: los procedimientos de transfección de ADN varían desde la microinyección en el MAC, pasando por la electroporación en el MAC hasta el bombardeo biolístico del MIC y el MAC. Están disponibles plásmidos episomales basados en un replicón de ADNr, así como técnicas knock-out/in basadas en recombinación homóloga. Se ha realizado expresión heteróloga a nivel de proteínas de especies relacionadas y también se han silenciado proteínas endógenas por medio de una novedosa técnica ribosómica antisentido. Se ha demostrado el potencial biotecnológico de *Tetrahymena* en numerosas publicaciones, demostrando rápido crecimiento, alta biomasa, fermentación en equipos convencionales de bacterias/levaduras, mejoramiento de la producción, existencia de medios baratos y químicamente definidos.

Hasta ahora, se han caracterizado sólo unas pocas secuencias de ADN de promotores activos de *Tetrahymena* útiles para trabajar en biología molecular. Estos comprenden el más bien débil y además dependiente del ciclo celular promotor de histona¹ y beta tubulina² y también los promotores de metalotioneína inducibles por metales pesados.^{3,4} Las metalotioneínas; que son reguladas por incremento tras el estrés, son proteínas de unión a metales que desempeñan una función en la desintoxicación de la célula. En *Tetrahymena* se conocen metalotioneínas, cuyos promotores pueden ser inducidos bastante bien por la presencia de cadmio, cobre, cinc (la inducción decrece en este orden) pero apenas con otros factores de estrés como los peróxidos o el calor. Como los metales pesados son tóxicos, inhiben el crecimiento de las células y dan lugar (en concentraciones más elevadas) a la muerte celular, sería favorable un sistema diferente con un menor impacto en la salud del sistema y un inductor que pueda eliminarse sin que queden trazas. Además, debido al fuerte impacto que tienen los cationes de los metales pesados sobre el medio ambiente, la eliminación del medio contaminado consume mucho tiempo y recursos. Como el esfuerzo financiero en los procesos de bioproducción comercial debe ser mínimo, los promotores de metalotioneínas no parecen ser el sistema inducible de elección.

Descripción de la invención

Las proteínas de choque térmico, HSP, son proteínas de respuesta al estrés evolutivamente conservadas con múltiples funciones de protección dentro de la célula. Estas proteínas son ubicuas, se encuentran en todo los organismos eucariotas estudiados hasta la fecha y son inducibles mediante calor, estrés, así como por una diversidad de otros agentes externos. Por consiguiente, las células responden a estos inductores, tales como las temperaturas elevadas de crecimiento, sintetizando altos niveles de HSP y reduciendo de manera coordinada la tasa de síntesis de otras proteínas celulares. Las HSP se dividen en varios grupos en base al tamaño. Su aparición en *Tetrahymena* ha sido descrita hace más de 20 años, también.⁵ En *Tetrahymena thermophila* se han descrito cuatro proteínas pertenecientes a la familia de HSP70 (Nº de acceso AK29100) y HSP90 (Nº de acceso AAD41357) y se han caracterizado en términos de secuencias parciales de aminoácidos,⁶ pero aún no se han dilucidado las secuencias del promotor activo.

La regulación de las HSP en otros sistemas ha sido estudiada extensamente por varios autores y se ha demostrado que la fuerza del promotor no es la única responsable del nivel de expresión de proteínas: para HSP70 de *Drosophila* se sabe que también las regiones 3' no traducidas de las transcripciones del gen de hsp70 son responsables de regular el nivel de síntesis de proteína o de ARNm en la célula tanto en estado inducido como no inducido. En la región del promotor se encuentra un elemento de choque térmico HSE en posición 5' al inicio ATG de los genes de choque térmico eucariotas.⁷ Esta región incluye las secuencias nGAAn y nTTCn, repetidas al menos dos veces en orientación cabeza a cabeza o cola a cola. El número y la orientación de los HSE en los genes HSP difieren entre especies, pero la unión de un factor positivo de transactivación, el factor de choque térmico (HSF) a los elementos de choque térmico es aproximadamente cien veces superior que el de cualquier otro factor de transcripción de mamífero conocido a su sitio de unión respectivo, convirtiendo a estos promotores en los más fuertes conocidos hasta el momento.

Por consiguiente, los promotores de HSP de diversos organismos han sido usados en sistemas de expresión heterólogos para muchas proteínas.^{8,9}

5 Como los genomas de los organismos no sólo varían en su utilización de codones sino también en su contenido de AT, es obvio que los promotores de especies menos relacionadas no funcionarán si se intercambian entre estos sistemas. En el reino de los protistas, los genomas son muy ricos en AT y, como se señaló anteriormente, sólo algunos promotores han sido caracterizados. Se ha descubierto que los promotores muy conocidos y ampliamente utilizados de levaduras, *E. coli*, mamíferos y virus no funcionan en los ciliados (observación no publicada propia).

Sin embargo, la presente divulgación muestra que los promotores de la familia de proteínas de choque térmico de *Tetrahymena* pueden utilizarse para la expresión controlada de genes externos en niveles elevados. El promotor inducible por calor según la invención tiene la secuencia de nucleótidos de ID Sec. Nº 1, denominado también promotor HSP90, o sus fragmentos eficaces como promotor.

10 La presente invención también está dirigida a la utilización de los promotores inducibles por calor según la invención para la expresión de proteínas homólogas y/o heterólogas en el ciliado *Tetrahymena thermophila*.

Puede resultar de preferencia que el promotor inducible por calor según la invención esté integrado en un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés. Este vector contiene de preferencia la secuencia terminadora de β -tubulina 2 de *Tetrahymena thermophila* adyacente a la posición 3' de la secuencia codificadora de la proteína de interés.

15 Estos promotores son inducibles sólo por calor y no necesitan la adición de sustancias químicas. La inducción del producto es múltiple. El nivel de fondo de actividad de transcripción es bajo con lo que se demuestra que son promotores ideales tanto para productos tóxicos como letales y por otra parte sirven como herramientas muy útiles para desactivaciones y activaciones condicionales. Durante la fermentación, el proceso de síntesis puede detenerse fácilmente simplemente bajando la temperatura: las células se recuperarán y la biosíntesis podrá volver a inducirse nuevamente. Esto ofrece rendimientos más altos que otros sistemas: como fermentación continua es un procedimiento bien establecido para ciliados y como el estrés térmico puede extraerse del cultivo fácilmente, el ciclo de producción puede repetirse una y otra vez. En el ejemplo que se presenta a continuación los ARNm heterólogos producidos son más estables que los ARNm de HSP endógenos: esto se consigue mediante el uso de un terminador 3' de β -tubulina 2 de *T. thermophila*. Por esta razón el ARNm del gen diana está todavía presente y se traduce en la fase de recuperación del cultivo. Estas propiedades de la invención dan lugar a un proceso de producción nuevo y eficiente hasta el momento no descrito.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

30 La Figura 1 muestra el plásmido de expresión utilizado para verificar la biosíntesis de proteínas del gen extraño dirigida por secuencias de diferentes promotores activos. El vector consiste en una estructura central bacteriana para amplificación en *E. coli* (sector gris oscuro), un origen específico de *T. thermophila* (sector gris claro) para estabilidad del plásmido en *T. thermophila*, una casete de selección a base de neomicina (flecha blanca) para identificación de los ciliados transformados y un marco de lectura abierto de una proteína informadora (flecha negra) seguido por la secuencia terminadora de β -tubulina 2 de *T. thermophila* (sector blanco). Las secuencias del promotor putativo (sector negro) pueden clonarse en este vector por medio de cortes únicos con endonucleasas de restricción XhoI y EcoRV.

Figura 2

40 Transferencia Western de diferentes productos transformados de *T. thermophila* que muestran expresión de EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) recombinante tras la inducción.

Carril 1: control positivo, carril 2: control negativo de 1.000 células (tipo natural), carril 3: 1.000 células pPT HSP90 no inducidas, carril 4: 1.000 células pPT HSP90 inducidas durante 4 horas, carril 5: 1.000 células pPT MTT no inducidas, carril 6: 1.000 células pPT MTT inducidas durante 4 horas.

La invención se describirá a continuación con más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

45 La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor HSP90 (ID Sec. Nº 1)

Ejemplo

El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar las formas de realización de la presente invención pero no pretende limitar su alcance.

Cultivo y transformación de *Tetrahymena*

50 Todas las cepas utilizadas se obtuvieron de *Tetrahymena thermophila* y han sido descritas anteriormente en detalle. La transformación de las células de *T. thermophila* se realizó con modificaciones según se publicaron con anterioridad.^{10,11} El cultivo se llevó a cabo a 30 °C. La expresión del gen diana se indujo por choque térmico a 41 °C (HSP) o por adición de Cd²⁺ (MTT1) 20 nM.

Clonación de las regiones del promotor HSP, secuencias codificadoras y construcción del vector

La ID Sec. N° 1 se amplificó a partir de ADN genómico de *T. thermophila* por medio de dos cebadores HSP90_D ATATCTCGAGAGCATGCTTTTTCATGTAATTTCC y HSP90_I ATCCATTTCTTATGATATATAATTAATTGC, las bases subrayadas corresponden a la extensión de los cebadores. El fragmento obtenido por pcr se sometió a electroforesis en gel, se purificó, se cortó por medio de XhoI y se unió en el vector pPT Cilian, dando un vector pPT HSP90 funcional de *Tetrahymena*, que expresa un gen que codifica EGFP bajo el control de la secuencia citada anteriormente. La región 3' de la sdc del gen de EGFP está adyacente a la secuencia terminadora del gen de β -tubulina 2 de *T. thermophila* (véase Figura 1). Se construyó un vector de control (pPT MTT1) utilizando el promotor MTT1 de la misma manera por medio del par de cebadores MTT1_D ATATCTCGAGGATAAGTAATATATTTAGTGCACAATGTTTGAATG y MTT1_I ATCCATTATTTAAGTTTAGATTATTATTATTATTATTAG.

Detección de EGFP

Se hicieron hervir los productos transformados recogidos de *T. thermophila* en tampón de muestra con SDS y se sometieron a electroforesis en gel en presencia de SDS. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la EGFP se detectó por medio de un primer anticuerpo específico seguido por un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante en combinación con Pierce SuperSignal en un raytest AIDA.

Expresión inducible, heteróloga de una proteína informadora bajo el control de HSP90 de *T. thermophila*

Para probar si el promotor HSP identificado es capaz de expresar genes extraños, se separaron cultivos celulares de *T. thermophila* en crecimiento exponencial transfectados con pPT HSP90; la mitad se cultivó a 30 °C, la otra mitad se sometió a choque térmico. Se indujo la expresión del gen extraño dirigida por el promotor MTT1 en células transformadas con pPT MTT1 mediante la adición de cadmio.

La Figura 2 muestra una transferencia Western de lisados celulares de estos cultivos. Sólo las células transformadas con pPT muestran bandas detectables que migran en el mismo peso molecular que el control. El control de tipo natural (carril 2) está completamente blanco. Resulta evidente una fuerte inducción de la expresión por calor (carril 4) o por cadmio (carril 6) en comparación con las células no inducidas (carriles 3 y 5). Además las células no inducidas muestran actividad basal muy baja en ambos sistemas de promotores.

De los datos que se muestran en la figura 2 se puede concluir, que la actividad del promotor de ID Sec. N° 1 (HSP90) puede ser controlada tan rigurosamente como la actividad del promotor MTT1 ya publicada y que es comparativamente fuerte.

Por consiguiente, los promotores inducibles por calor según la invención pueden ser usados en todas las aplicaciones biotecnológicas, como las enumeradas para el promotor MTT1 en ¹², y aún sigue siendo superior y favorable debido a su capacidad de inducción no tóxica.

Referencias

1. Kahn, R. W., Andersen, B. H. & Brunk, C. F. Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of a foreign gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 9295-9299 (1993).
2. Peterson, D. S., Gao, Y., Asokan, K. & Gaertig, J. The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. Mol. Biochem. Parasitol. 122, 119-126 (2002).
3. Shang, Y. et al. A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 3734-3739 (2002).
4. Boldrin, F., Santovito, G., Negrisolo, E. & Piccini, E. Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. Protist. 154, 431-442 (2003).
5. Fink, K. & Zeuthen, E. Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. Exp. Cell Res. 128, 23-30 (1980).
6. Williams, N. E. & Nelsen, E. M. HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of *Tetrahymena*. J. Cell Sci. 110 (Pt 14), 1665-1672 (1997).
7. Sorger, P. K. Heat shock factor and the heat shock response. Cell 65, 363-366 (1991).
8. Asano, M., Nagashima, H., Iwakura, Y. & Kawade, Y. Interferon production under the control of heterologous inducible enhancers and promoters. Microbiol. Immunol. 32, 589-596 (1988).

9. Maggi, R. G. & Govind, N. S. Regulated expression of green fluorescent protein in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 301-310 (2004).

5 10. Gaertig, J., Thatcher, T. H., Gu, L. & Gorovsky, M. A. Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4549-4553 (1994).

11. Gaertig, J. & Gorovsky, M. A. Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9196-9200 (1992).

12. Gorovsky, M. A., Shang, Y. & Song, X. *Tetrahymena* Metallothionein gene promoter and its use.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Cillian AG

<120> Promotores inducibles por calor de *Tetrahymena* y su uso

<130> 061725wo Me/FM

<140>

<141> 13-07-2005

15 <160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 980

<212> ADN

20 <231> *Tetrahymena thermophila*

<400> 1

	agcatgcttt	ttcatgtact	attcctaact	atagcttaat	gctttataca	tcaaagtatg	60
	aagaagacag	gttttaaaaa	accaaataat	atgtttttta	tttgaaaagt	attatatagg	120
	aataataaat	gctgcataaa	tactctaagt	agttgataaa	aatctatatt	atgcaaagaa	180
	aaatttagaa	aaatttagaa	aaacaaagaa	aataattggt	attataaagc	atthttgttt	240
	ctaagcaaaa	gatataaaat	ttgagataga	aatatacata	caagattaac	gtttttgtttg	300
25	tgctttgaaa	attgaaatat	ttaattatta	aatctgctaa	ctttttttaga	tatttatttg	360
	ctttatthta	tttttttaaat	ttttgcaaag	tggagaaaaa	tgaacaatc	aatctthttt	420
	ttataaataa	tataaatggt	attaagccta	atthtttattg	ctggagagtg	ttattcaaat	480
	atattgctga	atgtggctag	atggaattcg	ctttggaagg	aaagtgttta	taaaataagt	540
	gatgtattat	agcacattgc	taattattat	aaagaatgta	ttggatattt	aaaaattaga	600
	aaataaaatt	tagctgaaaa	gtaagaaagc	aagcaaagat	atatatatat	atatggagat	660
	gataaaaaga	taaattcgaa	aaaagaaaat	ttctaaagtg	aaaagaatta	tggatttgat	720
	taaataaaaa	tattttttaga	atgggctgat	taaagaggga	tcttcgagaa	tgaaatgatt	780
	tagaaaaaaa	gaaagaaaga	ttataacatc	tacaaagagt	tgaagattct	agaagaggag	840
30	gaataattag	ctatcagtct	tattaaaaga	tatcgcaaaa	caagaatat	ttttgaaatt	900
	aattaaaaaa	tttaaaaaac	aaaagataaa	aatthttgcac	aaaaaagcaa	ttaattaaaa	960
	aaaaagatat	atcataagaa					980

REIVINDICACIONES

1. Promotor inducible por calor de la familia de proteínas de choque térmico del ciliado *Tetrahymena thermophila*, según el cual el promotor tiene la secuencia de nucleótidos de ID Sec. N° 1 o sus fragmentos eficaces como promotor.
- 5 2. Uso del promotor inducible por calor de la reivindicación 1 para la expresión de proteínas heterólogas en el ciliado *Tetrahymena thermophila*.
3. Uso según la reivindicación 2, según el cual el promotor inducible por calor está integrado en un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés.
- 10 4. Uso según la reivindicación 2 y/o 3, según el cual el vector contiene la secuencia terminadora de β -tubulina 2 de *Tetrahymena thermophila* adyacente a la posición 3' de la secuencia codificadora de la proteína de interés.

Fig. 1
Vector de expresión pPT HSP

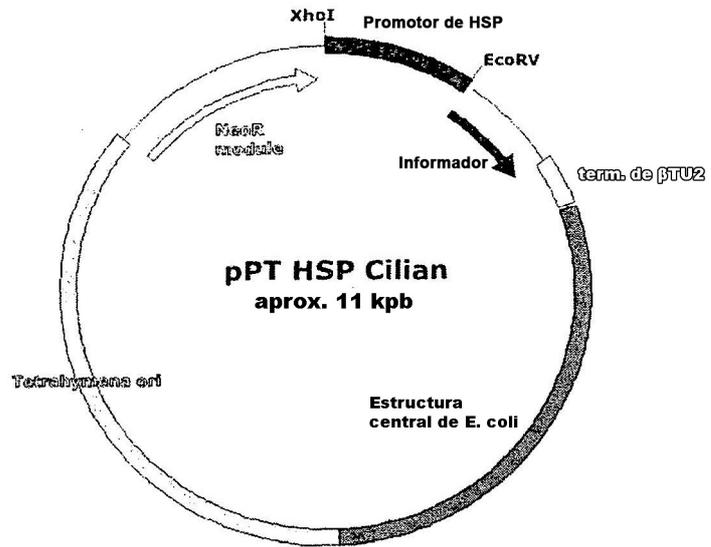


Fig. 2

Expresión heteróloga del gen informador

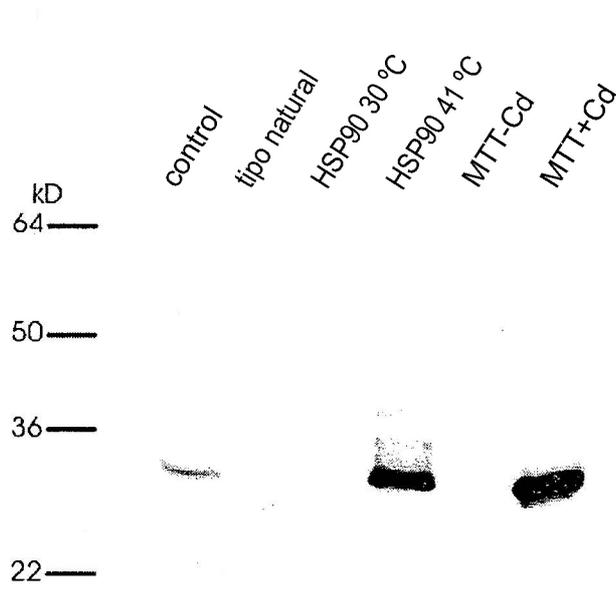


Figura 3**ID Sec. N° 1**

agcatgcttt tcatgtact attcctaact atagcttaat gctttataca tcaaagtatg 60
 aagaagacag gttttaaaaa accaaaaaat atgttttta ttgaaaagt attatatagg 120
 aataataaat gctgcataaa tactctaagt agttgataaa aaatctattt atgcaaagaa 180
 aaatttagaa aaatttagaa aaacaagaa aataattggtt attataaagc attttgttta 240
 ctaagcaaaa gatataaaat ttgagataga aatatacata caagattaac gttttgtttg 300
 tgctttgaaa attgaaatat ttaattatta aatctgctaa cttttttaga tatttatttg 360
 ctttatttta tttttaaat ttttgcaaag tggagaaaaa tgaacaatc aatctttttt 420
 ttataataa tataaatggt attaagccta atttttattg ctggagagtg ttattcaaat 480
 atattgctga atgtggctag atggaattcg ctttgaagg aaagtgtta taaaataagt 540
 gatgtattat agcacattgc taattattat aaagaatgta ttgatattt aaaaattaga 600
 aaataaaatt tagctgaaaa gtaagaaagc aagcaaagat atatatatat atatggagat 660
 gataaaaaa taaattcgaa aaaagaaat ttctaaagtg aaaagaatta tggatttgat 720
 taataaaaaa tatttttaga atgggctgat taaagaggga tcttcgagaa tgaatgatt 780
 tagaaaaaaa gaaagaaaga ttataacatc tacaagagt tgaagattct agaagaggag 840
 gaataattag ctatcagtct tattaaaaga tatcgcaaaa caagaaatat ttttgaatt 900
 aattaaaaaa tttaaaaaac aaaagataaa aattttgcac aaaaaagcaa ttaattaaaa 960
 aaaaagatat atcataagaa 980