



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 156**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06708326 .1**

96 Fecha de presentación : **16.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1848814**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Procedimiento de cribado para la identificación de mutantes de microorganismos deficientes en la secreción de proteasas.**

30 Prioridad: **16.02.2005 EP 05003272**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.09.2011**

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

72 Inventor/es: **Hartmann, Marcus y**  
**Broermann, André**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 156 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

Procedimiento de cribado para la identificación de mutantes de microorganismos deficientes en la secreción de proteasas

Es objeto de la invención un procedimiento para la identificación de cepas de microorganismos deficientes en la secreción de proteasas.

5 En la biotecnología existe una gran necesidad de sistemas de expresión con los que puedan producirse proteínas en grandes cantidades y en la forma en que se presentan fisiológicamente. Una de muchas posibilidades es la expresión heteróloga en microorganismos que producen las proteínas, dado el caso modificarlas post-traduccionalmente y secretarlas entonces. El fundamento para esto es modificar genéticamente el microorganismo para que produzca la proteína extraña. Entre los organismos en los que se lleva a cabo una expresión heteróloga y una secreción subsiguiente se cuentan ciliados como *Tetrahymena* y levaduras como *Pichia pastoris*.

10 La utilización de tales sistemas de expresión heteróloga ofrece muchas ventajas. Así, es posible recurrir a *T. termophila* económicamente y llegar en poco tiempo a elevadas densidades celulares (SALIBA y col., 1983; KIY & TIEDTKE, 1992). Además se han establecido métodos para modificar organismos por ingeniería genética con los que pueden producirse proteínas extrañas en grandes cantidades (TONDRAVI & YAO, 1986, YU y col., 1990; GAERTIG & GOROVSKY, 1992; GAERTIG y col., 1994, CASSIDY-HANLEY y col., 1997). Estas proteínas se glicosilan de forma similar a las proteínas humanas, lo que las hace interesantes para una utilización farmacéutica (TANIGUCHI y col.; 1985). Una de las ventajas esenciales de este sistema de expresión consiste en que las proteínas sintetizadas por *T. termophila* se secretan al medio, lo que simplifica la purificación de las proteínas (KIY, 1993).

20 Un problema en el uso de tales sistemas de expresión heteróloga es sin embargo frecuentemente la secreción natural de proteasas. Así, es sabido por ejemplo que la *T. termophila* secreta de modo natural grandes cantidades de proteasas al medio (BANNO & NOZAWA, 1982, Banno y col., 1982; Banno y col., 1983). Como estas proteasas no se han caracterizado, apenas hay informaciones más detalladas. Las proteínas expresadas heterológamente son en comparación con las proteínas endógenas claramente más susceptibles a la degradación proteolítica. Por el contrario, la actividad funcional de las enzimas extracelulares de *T. termophila* no se limita substancialmente por las proteasas secretadas (KIY, 1993b). La consecuencia de la actividad proteolítica es una significativa reducción del rendimiento de la proteína expresada heterológamente.

30 Para evitar la degradación son posibles distintos planteamientos, como la adición de inhibidores de proteasas o de substratos competitivos como la caseína, o la producción de cepas con menor actividad proteolítica. Actualmente, sin embargo, por ejemplo para *Tetrahymena termophila*, no hay disponible ninguna cepa deficiente en la secreción de proteasas. Se ha descrito ya un mutante (HÜNSELER y col.; 1987) que generalmente está limitado en su secreción. Un mutante semejante es sin embargo inadecuado para la expresión heteróloga de proteínas, pues ciertamente no secretan proteasas, pero tampoco las proteínas objetivo deseadas.

35 La determinación de los mutantes deficientes en secreción se realizó conforme a HÜNSELER y col., 1992 con un procedimiento de cribado. A este respecto se punzonaron en una placa de agar agujeros que se aspiraron con una pipeta. En estos agujeros se vertieron los cultivos celulares. El procedimiento es relativamente complicado y no automatizable. Existe también el peligro de contaminaciones cruzadas en caso de dañarse la fina capa de agar. El procedimiento tampoco puede utilizarse o automatizarse a gran escala.

En general existe para sistemas de expresión secretores una alta necesidad de cepas con menor o sin ninguna actividad proteolítica.

40 Se ha desarrollado ya un procedimiento para el cribado de mutantes hipersecretores de *T. termophila* (HARTMANN, 2000). En este método los mutantes se ponen en placas de microvaloración de 96 pocillos. Las células se separan entonces por ultracentrifugación en una zona de distinta densidad. A este respecto a cada uno de los cultivos se le pone una capa inferior de polímero (Ficoll) y las células se centrifugan en el Ficoll. El sobrenadante se retiró con una pipeta. Por ensayo enzimático se determinaron mutantes que presentaban elevada actividad en proteínas secretadas como  $\beta$ -hexaminidasa y fosfatasa ácida.

45 Este procedimiento exige un elevado coste en tiempo. Además no puede excluirse que se llegue a una lisis celular en la que no se liberen proteínas secretadas que modifiquen el resultado.

50 La invención se plantea el objetivo de proporcionar un procedimiento para el cribado conforme a sistemas de secreción mejorados para la expresión heteróloga de proteínas. En especial el procedimiento debe hacer posible el hallazgo de mutantes de microorganismos que presenten un rendimiento mejorado en proteínas expresadas heterológamente secretadas.

El procedimiento debe hacer posible analizar en poco tiempo y a costes moderados una multiplicidad de mutantes.

El objetivo que se plantea la invención se ha conseguido sorprendentemente mediante un procedimiento y microorganismos conforme a una de las reivindicaciones 1 a 15.

5 En general el procedimiento puede llevarse a cabo con mutantes de microorganismos que secretan proteasas y que son adecuados para la secreción de proteínas objetivo expresadas heterológamente. Con el término de proteasas de secreción se quiere decir aquellas proteasas que secreta el tipo natural del microorganismo a su entorno. El procedimiento conforme a la invención hace posible la medición de la actividad de proteasas *in vivo*.

10 El microorganismo se selecciona preferiblemente del grupo compuesto por ciliados y levaduras. Tales microorganismos expresan proteínas propias con actividad enzimática como proteasas. Son levaduras especialmente adecuadas *Pichia pastoris*. El procedimiento es adecuado también para el cribado de algas monocelulares, en especial de *Chlamydomonas*, *Ulva* y *Euglena*, y procariontas, en especial *Bacillus* y *Escherichia*. Son ciliados especialmente adecuados aquellos del género *Tetrahymena*, en especial *Tetrahymena thermophila*, *malaccensis*, *elliotti*, *alphaelliotti*, *pyriformes*, *setosa*, *alphapyriformis*, *betapyriformis*, *leucophyris*, *silvani*, *vorax*, *tropicalis*, *deltatropicalis*, *borealis*, *canadensis*, *rostrata*, *alphacanadensis*, *betacanadensis*, *mimbres*, *americanis*, *paraamericanis*, *australis*, *hegewishi*, *hyperangularis*, *nanneyi*, *nippisingi*, *pigmentosa*, *pigmentosa oriasi*, *pigmentosa europigmentosa*, *sonneborni*, *asiatica*, *capricornis*, *patula*, *allensae*, *cosmopolitanis* o *shanghaiensis*.

15 Los mutantes de los microorganismos pueden producirse por métodos conocidos, como mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida. El procedimiento es especialmente ventajoso con microorganismos con los que no se obtienen o solo difícilmente cepas deficientes en secreción de proteasas por motivos técnicos o debido a la falta de información genética. Son especialmente preferidos procedimientos genéticos de cruce.

20 Un procedimiento especialmente preferido para la producción de mutantes es la citogamia uniparental (UPC). Se trata de un procedimiento genético de cruce. Este se lleva a cabo preferiblemente como se describe por Cole y Bruns (1992). Con ello se hace referencia expresa al procedimiento ahí descrito. Este procedimiento permite expresar hasta 20 veces más mutaciones que, por ejemplo, el procedimiento de exclusión del genoma por cortocircuito utilizado por Hünseler y col. (1987). De este modo el rendimiento de mutantes es mayor en un factor de 20.

25 La incubación del mutante del microorganismo se realiza con el gel preferiblemente en un medio acuoso adecuado, preferiblemente un medio nutritivo. En cualquier caso deben reinar condiciones (valor del pH, concentración de iones, etc.) que se parezcan a las condiciones fisiológicas, de modo que se impida la muerte y la lisis de los microorganismos.

30 La incubación de los microorganismos con el gel se realiza en formas de realización preferidas durante 2 h a 2 semanas, en especial durante 1 a 5 días.

Son medios nutritivos adecuados o contienen leche en polvo desnatada, proteosa-peptona, extracto de levadura, peptona de habas de soja, solución de sulfato/quelato ferroso (100X, fa. Sigma) y/o glucosa monohidratada. También puede utilizarse un medio químico definido (CDM) conforme a una formulación precisa de los distintos ingredientes.

35 Como gel se utiliza en formas de realización preferidas gel de gelatina, de agarosa, de agar y/o de poliacrilamida. El tamaño de grano o el grado de reticulación se selecciona de modo que las proteínas secretadas como proteasas puedan difundirse en el gel, mientras que los microorganismos queden substancialmente excluidos del gel.

40 En formas de realización preferidas el sustrato para la proteasa se selecciona del grupo constituido por caseína, derivados de caseína, caseína marcada fluorescentemente y/o gelatina. Son especialmente adecuados la caseína BODIPY FL y la caseína BODIPY Tr-X (Molecular Probes Inc., EEUU) o péptidos o proteínas marcados fluorescentemente de modo similar.

La incubación se realiza preferiblemente en condiciones en las que el microorganismo secreta proteasas y las proteasas secretadas pueden difundirse en el gel.

La separación del microorganismo del gel se realiza por decantación, con pipeta, por aspiración y/o por lavado.

45 En una forma de realización preferida la proteólisis del sustrato produce una señal de fluorescencia o absorción, cuya intensidad se mide y con el resultado se determina la actividad de proteasas.

50 El procedimiento conforme a la invención se lleva a cabo usando una placa de microvaloración. En las cavidades (pocillos) de la placa se genera respectivamente un gel. Esto se realiza habitualmente por vertido de una solución, por ejemplo una solución de agarosa, en las cavidades y subsiguiente enfriamiento. Son preferidas placas de microvaloración habituales de 96 cavidades. El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de modo

automatizado y/o usando una multiplicidad de mutantes a ensayar. En cada cavidad de la placa de microvaloración se añade un mutante. Esto no debe significar que solo se añada una única célula. Pueden añadirse múltiples células con idéntico ADN. Una multiplicidad semejante de células se genera individualizando estas y reproduciéndolas después.

5 El procedimiento de la invención hace posible el cribado selectivo en busca de mutantes que específicamente no secreten al medio ninguna proteasa o estas sean poco activas, mientras que la secreción de otras proteínas y de al menos las proteínas expresadas heterológamente preferiblemente no esté limitada o solo en pequeña medida. A este respecto es de poca importancia para el modo de funcionamiento del ensayo que las proteasas se secreten en forma inactiva o no se secreten en absoluto. Lo decisivo es que la actividad de proteasas reducida tenga por  
10 consecuencia un incremento en el rendimiento de la proteína objetivo.

Ya están establecidos procedimientos para la generación de mutantes de ciliados por mutagénesis aleatoria (CRUEGER & CRUEGER, 1989). Igualmente se han descrito maniobras genéticas de cruce con las cuales puede expresarse una mutación (COLE & BRUNS, 1989). Estos procedimientos son necesarios con *T. thermophila* debido al dimorfismo nuclear. Además es posible distribuir los mutantes en placas de microvaloración de 96 pocillos usando un  
15 equipo distribuidor y la lotería de Poisson.

El procedimiento conforme a la invención presenta numerosas ventajas frente a otros procedimientos conocidos:

El procedimiento es específico, pues no se determinan mutantes cuyo sistema de secreción esté afectado en general y que por consiguiente no serían adecuados para la secreción heteróloga de otras proteínas.

20 Se genera exclusivamente una señal por la actividad de las proteasas secretadas en el medio. Debido a las suaves condiciones de ensayo no se produce durante el cribado lisis celular alguna y por consiguiente no se falsea el resultado por proteasas intracelulares.

Pueden utilizarse distintos substratos de proteasa inespecíficos. Esto es ventajoso, pues sobre la especificidad de substrato de proteasas secretadas, por ejemplo en el caso de ciliados, se sabe poco. Por tanto, el cribado proporciona resultados que se refieren a la actividad de proteasas total.

25 El procedimiento conforme a la invención es sencillo y puede llevarse a cabo rápidamente y permite la investigación de cultivos de ciliados en su medio nutritivo. De este modo se suprimen pasos de purificación, como la centrifugación, posteriores en el procedimiento (Hartmann y col., 2000). El sencillo procedimiento permite ensayar en grandes cantidades de mutantes, por ejemplo a escala de 96 pocillos, la actividad de proteasas extracelulares.

30 En especial en la producción de un elevado número de mutantes se consigue una eficiencia muy elevada mediante citogamia uniparental (UPC).

El procedimiento proporciona mutantes que a continuación pueden analizarse más precisamente en lo relativo a sus propiedades de secreción. Las cepas obtenidas pueden utilizarse entonces como sistemas de expresión heteróloga.

35 El procedimiento aprovecha la difusión de las proteasas expresadas en un gel. Procedimientos para encontrar proteasas en el que las proteasas se transfieren a un gel ya eran conocidos por el estado de la técnica, por ejemplo Paech y col., 1993. Se trata a este respecto de procedimientos en los que las proteasas por una parte se purifican antes de introducirlas en el gel, y por otra parte se separan en el gel por electroforesis. El procedimiento conforme a la invención es totalmente diferente, pues no es precisa ninguna purificación de las proteasas y porque no se realiza ninguna electroforesis ni aplicación de una tensión eléctrica.

Un procedimiento de cribado conforme a la invención puede llevarse a cabo por ejemplo del modo siguiente:

40 Los mutantes se cultivan en las cavidades de una placa de microvaloración de 96 pocillos. Los cultivos se encuentran en un medio nutritivo líquido que se encuentra sobre una capa de agarosa. Durante la incubación se difunden las enzimas extracelulares, entre otras también las proteasas, en parte en la agarosa. Después de extraer el medio nutritivo con las células por inclinación, se añadió un derivado de caseína sobre la agarosa, que igualmente se difunde en parte en el gel. Si este derivado de caseína se disocia por actividad proteolítica, aparece una señal de  
45 fluorescencia que es proporcional a la actividad de proteasas. La intensidad de la señal puede detectarse por ejemplo usando un lector de fluorescencia de placas de microvaloración en el marco de una determinación de punto final o registrando la cinética. De este modo, una señal de fluorescencia pequeña es indicación de una cepa deficiente en la secreción de proteasas.

50 En otra forma de realización puede llevarse a cabo un procedimiento de cribado conforme a la invención del modo siguiente:

- Los cultivos ya incubados algún tiempo en placas de microvaloración se aplican mediante una pipeta de 8 canales en forma de puntos sobre el lado recubierto con gelatina de una película de rayos X totalmente expuesta y revelada. Las gotas están constituidas por medio nutritivo en el que ya se han secretado durante la incubación las enzimas extracelulares. Además, las células se encuentran en el medio. Hay que prestar atención a que los gotas no se sequen para evitar una lisis celular. Las gotas permanecen algún tiempo sobre la gelatina, de modo que esta puede ser hidrolizada por las proteasas presentes. Si entonces las gotas se retiran por aclarado de la película y a continuación la película se coloca en un tampón especial, en los lugares en los que la gelatina se haya hidrolizado se forman aureolas claras. Una aureola clara semejante es por consiguiente una indicación de elevada actividad de proteasas extracelulares.
- Los procedimientos conforme a la invención se caracterizan porque se detecta selectivamente la actividad de las proteasas en el sobrenadante, sin que sean necesarios costosos procedimientos para la obtención de un sobrenadante exento de células. Además es posible ensayar las cepas en relación a la actividad de proteasas que no se hayan caracterizado más detalladamente, pues se utilizan substratos inespecíficos (derivados de caseína, gelatina). Ambos procedimientos se caracterizan porque pueden realizarse rápidamente y son de bajo coste, de modo que puede ensayarse un elevado número de mutantes.

### **Ejemplos de realización:**

#### Procedimiento 1:

- Las mutaciones se produjeron por mutagénesis aleatoria química y a continuación se expresaron por el procedimiento genético de cruce de la citogamia uniparental (brevemente: UPC) conforme a COLE y BRUNS, 1992. De este modo se generaron mutantes. Tras la producción de los mutantes se prepararon placas de microvaloración para el cribado:

- En las cavidades (pocillos) de una placa de microvaloración de 96 pocillos se vertió agarosa estéril (al 1%, p/v). Tras la solidificación esta se recubrió con medio nutritivo. La inoculación de las cavidades se realiza con las cepas mutagenizadas de *Tetrahymena* mediante un punzón de 96 puntas auto-fabricado a partir de placas de microvaloración anteriormente empleadas en las que se cultivaron los clones. Tras tres días de incubación a 30°C el medio nutritivo con las células se extrajo por inclinación (decantación) y las cavidades se lavaron dos veces con tampón (Tris-HCl; 50 mM; pH 7,4). En las cavidades se pusieron respectivos 100 µl de colorante de fluorescencia como sustrato para la reacción enzimática. Como sustrato se utilizan aquellos del kit EnzChek Protease Assay E-6638 (Molecular Probes Inc. EEUU). A este respecto el colorante se utiliza conforme a las indicaciones del fabricante, diluyendo la solución de uso de 1 a 2 con el tampón también suministrado. Mediante la dilución puede incrementarse claramente la cantidad de muestra sin que se afecte la sensibilidad del ensayo (Fig.1).

- Para la detección de la intensidad de fluorescencia se utilizó el lector FLx800 (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) con un par de filtros adaptados a la longitud de onda de excitación y detección. Como medida de la actividad de proteasas puede registrarse una cinética directamente tras adición del sustrato, siendo el grado del incremento proporcional a la señal de fluorescencia y por consiguiente también a la actividad de proteasas.

Como alternativa también es posible tras una hora de incubación a temperatura ambiente llevar a cabo una determinación de punto final. Los valores absolutos así obtenidos reflejan igualmente nuevamente la intensidad de fluorescencia o la actividad de proteasas.

#### Procedimiento 2

- Las mutaciones se produjeron por mutagénesis aleatoria química y a continuación se expresaron por el procedimiento genético de cruce de la citogamia uniparental (brevemente: UPC) conforme a COLE y BRUNS, 1992. De este modo se generaron mutantes. Tras la producción de los mutantes se prepararon placas de microvaloración para el cribado del modo siguiente:

- Se exponen películas de rayos X recubiertas con gelatina (Ferrania), se revelan y se fijan. Antes de la utilización, las películas se humedecen durante 10 min con tampón (Tris-HCl; 50 mM; pH 7,5). Tras este tratamiento previo los restos del tampón se retiran cuidadosamente con papel de filtro. Sobre el lado recubierto con gelatina se aplican 30 µl de cultivos de tres días de antigüedad de *Tetrahymena* con una pipeta de 8 canales. Hay que prestar atención a que las gotas no confluyan. Durante la incubación de una hora de las películas con las gotas a 30°C, las proteasas presentes en el medio hidrolizan la gelatina, sobreviviendo las células en el interior de las gotas. Tras el transcurso del tiempo de incubación las gotas se retiran de las películas por aclarado con agua destilada. Mediante otra incubación de un minuto de la película en tampón de glicina (0,1 M; pH 10,0; 50°C) pueden apreciarse aureolas claras en los lugares en los que se degradó la gelatina. Sin la capa de gelatina se lixivia el compuesto de plata que causa la coloración negra. El que se produzca o no una lixiviación depende por consiguiente de la magnitud de la

actividad de las proteasas secretadas. Igualmente, la degradación de la gelatina se influye por los parámetros tiempo de incubación y temperatura de incubación, de modo que el ensayo debe ajustarse a las condiciones respectivamente reinantes.

5 Mediante este nuevo procedimiento de cribado pudo aislarse un mutante de *Tetrahymena* que secreta al medio nutritivo proteasas claramente menos activas con secreción substancialmente no reducida de otras enzimas como  $\beta$ -hexaminidasa y fosfatasa ácida.

10 De este modo con el nuevo procedimiento de cribado pueden producirse mutantes que son exclusivamente deficientes en la secreción de proteasas, pero no están limitados en general en su capacidad de desprender proteínas al medio de cultivo circundante. Esto se ve claramente si las cinéticas de secreción de un mutante típico que se ha obtenido con el nuevo procedimiento de cribado se comparan con las cinéticas de secreción de cepas de tipo natural.

15 En la Fig. 3 y la Fig. 4 están representadas cinéticas de secreción de un mutante en comparación con las de cepas de tipo natural (cepa de tipo natural X y cepa de tipo natural CU 438.1). Las actividades en volumen para dos enzimas lisosómicas típicas secretadas, la beta-hexosaminidasa y la fosfatasa ácida, son en los mutantes comparables con las actividades en volumen en tipos naturales. En la Fig. 5 están representadas cinéticas de secreción para proteasas de un mutante y de dos tipos naturales. Aquí se ve claramente que el mutante durante la duración del cultivo desprende considerablemente menos proteasas al medio de cultivo circundante de lo que lo hacen las cepas de tipo natural.

#### Figuras:

20 La Figura 1 muestra un diseño esquemático del procedimiento de cribado por fluorescencia conforme a la invención.

La Figura 2 muestra una película de rayos X tras la realización del cribado.

la Figura 3 muestra una cinética de secreción con actividades en volumen de la  $\beta$ -hexosaminidasa en sobrenadante exento de células de un mutante y de las dos cepas de tipo natural X y Cu 438.1.

25 La Figura 4 muestra una cinética de secreción con actividades en volumen de la fosfatasa ácida en sobrenadante exento de células de un mutante y de las dos cepas de tipo natural X y Cu 438.1.

la Figura 5 muestra una cinética de secreción con actividades en volumen de las proteasas en sobrenadante exento de células de un mutante y de las dos cepas de tipo natural X y Cu 438.1.

#### Bibliografía:

30 BANNO, Y. & NOZAWA, Y. (1982): Changes in particulate-bound protease activity during cold acclimation in *Tetrahymena pyriformis*; *Biochim. Biophys. Acta* 719: 20-28

BANNO, Y., YANO, K. & NOZAWA, Y. (1982): Biochemical characterization of secreted proteases during growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-15: Comparaison of extracellular with intracellular proteases; *J. Protozool.* 29: 91-98

BANNO, Y., YANO, K. & NOZAWA, Y. (1983): Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*; *Eur. J. Biochem.*

35 CASSIDY-HANLEY, D., BOWEN, J., LEE, J. H., COLE, E., VERPLANKT, L. A., GAERTIG, J., GOROWSKY, M. A. & BRUNS, P. J. (1997). Germ-line and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment; *Genetics* 146: 135-147

COLE, E. S. & BRUNS, P. J. (1992): Uniparental Cytogamy: A novel method for bringing micronuclear mutations of *Tetrahymena* into homozygous macronuclear expression with precocious sexual maturity; *Genetics* 132: 1017-1031

40 CRUEGER, W. & CRUEGER A. (1989): *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie (Manual de biotecnología de la microbiología aplicada) 3ª edición.: Stammenentwicklung (desarrollo de cepas): 7-54;* Oldenburg Verlag GmbH, Múnich

GAERTIG, J., & GOROWSKY, M. A. (1992): Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9196-9200

45 GAERTIG, J., GU, L., HAI, B. & GOROWSKY, M. A. (1994): High frequent vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*; *Nucleic Acids Res.* 22: 5391-5398

- HARTMANN, M., GUBERMANN, A., FLORIN-CHRISTENSEN, M. & TIEDTKE, A. (2000): Screening for and characterization of phospholipase A1 hypersecretory mutants of *Tetrahymena termophila*; *Appl. Microbiol. Biootechnol.* 54: 390-396
- 5 HÜNSELER, P., SCHEIDGEN-KLEYBOLT, G. & TIEDTKE, A. (1987): Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena termophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes; *J. Cell Sci.* 88: 47-55
- KYT, T. & TIEDTKE, A. (1992): Continuous high-cell density fermentation of the ciliated protozoan *Tetrahymena* in a perfused bioreactor; *Appl. Microbiol. Biootechnol.* 38: 141-146
- 10 KYT, T. (1993): Fermentation von Ciliaten zur Produktion biogener Werkstoffe (Fermentación de ciliados para la producción de materiales biogénos); Tesis inaugural para la obtención del grado de Doctor; Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms Universität Münster
- PAECH, C., CHRISTIANSON, T., & MAURER, K.-H., (1993): Zymogram of proteases made with developed film from non-denaturing polyacrylamide gels after electrophoresis; *Analyt. Biochem.* 208: 249-254
- TANIGUCHI, T., MIZUOCHI, T., BANNO, Y., NOZAWA, Y. & KOBATA, A. (1995). Carbohydrates of lysosomal enzymes secreted by *Tetrahymena pyriformis*; *J. Biol. Chem.* 260 (26): 13941-13946
- 15 TONDRAVI, M. M., & YAO, M.-C. (1986): Transformation of *Tetrahymena termophila* by microinjection of ribosomal RNA genes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4369-4373
- YU, G. L., BRADLEY, ATTARDI, L. D. & BLACK-BURN, E. H. (1990): In vitro alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs; *Nature* 344: 126-132

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la identificación de cepas de un microorganismo deficientes en la secreción de proteasas,
  - en el que se producen mutantes del microorganismo,
  - en las cavidades de una placa de microvaloración se genera un gel,
- 5       · en cada una de las cavidades del gel se añade un mutante del microorganismo,
- se incuba en condiciones en las que los mutantes del microorganismo secretan proteínas,
- los mutantes del microorganismo se separan del gel,
- 10       conteniendo el gel al menos un substrato para al menos una proteasa de secreción del microorganismo y/o siendo el propio gel el substrato y/o añadiéndose el substrato más tarde y difundándose al menos parcialmente en el gel,
- y se mide la actividad de proteasas sobre el substrato.
2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el microorganismo se selecciona del grupo constituido por ciliados, en especial *Tetrahymena*, levaduras, en especial *Pichia pastoris*, algas unicelulares, en especial *Chlamydomonas*, *Ulva* y *Euglena*, y procariotas, en especial *Bacillus* y *Escherichia*.
- 15       3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 ó 2, en el que los mutantes del microorganismo se producen por mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida.
4. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 ó 2, en el que los mutantes del microorganismo se producen por citogamia uniparental (UPC).
- 20       5. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la incubación de los mutantes del microorganismo se realiza con el gel en un medio nutritivo.
6. Procedimiento conforme a la reivindicación 5, en el que el medio nutritivo contiene leche en polvo desnatada, proteosa-peptona, extracto de levadura, peptona de habas de soja, solución de sulfato/quelato ferroso y/o glucosa monohidratada, o es un medio sintético.
- 25       7. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el gel es un gel de gelatina, de agarosa, de agar y/o de poliacrilamida.
8. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el substrato para la proteasa se selecciona del grupo constituido por caseína, derivados de caseína, caseína marcada fluorescentemente y/o gelatina.
9. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la incubación se realiza en condiciones en las que el microorganismo secreta proteasas y las proteasas secretadas pueden difundirse en el gel.
- 30       10. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el microorganismo se separa del gel por decantación, con pipeta, por aspiración y/o por lavado.
11. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la proteólisis del substrato produce una señal de fluorescencia o señal de absorción, cuya intensidad se mide y con el resultado se determina la actividad de proteasas.
- 35       12. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el procedimiento se lleva a cabo de modo automatizado.

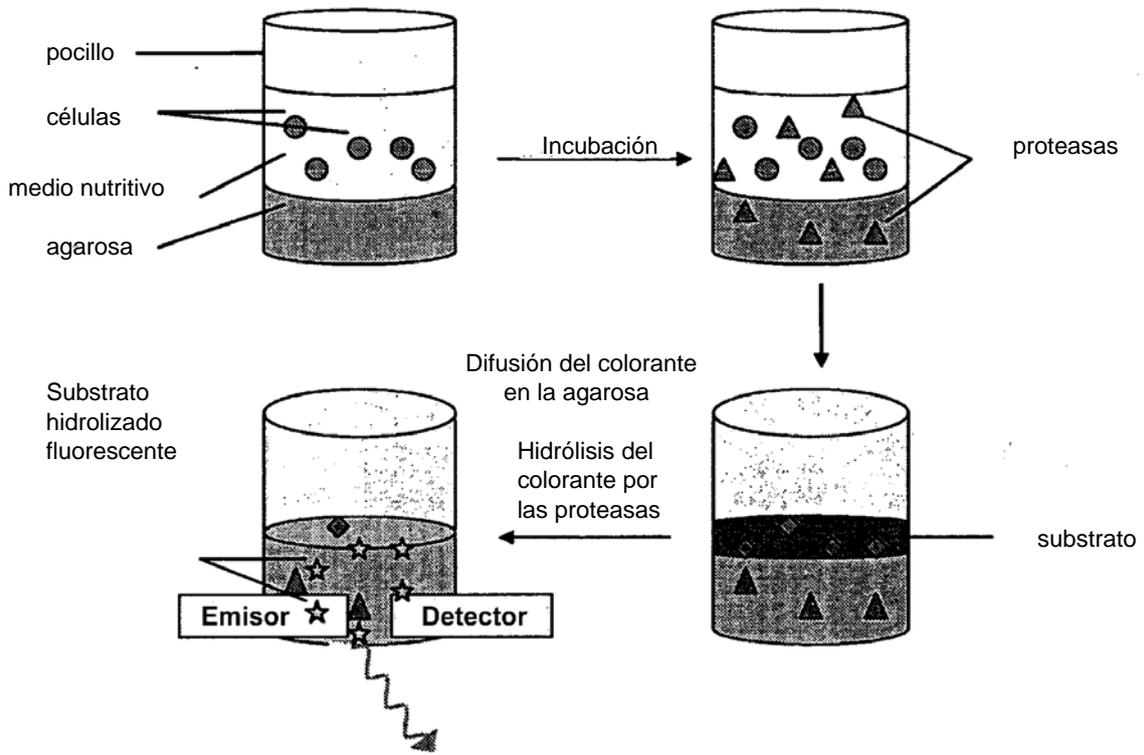


Fig.1

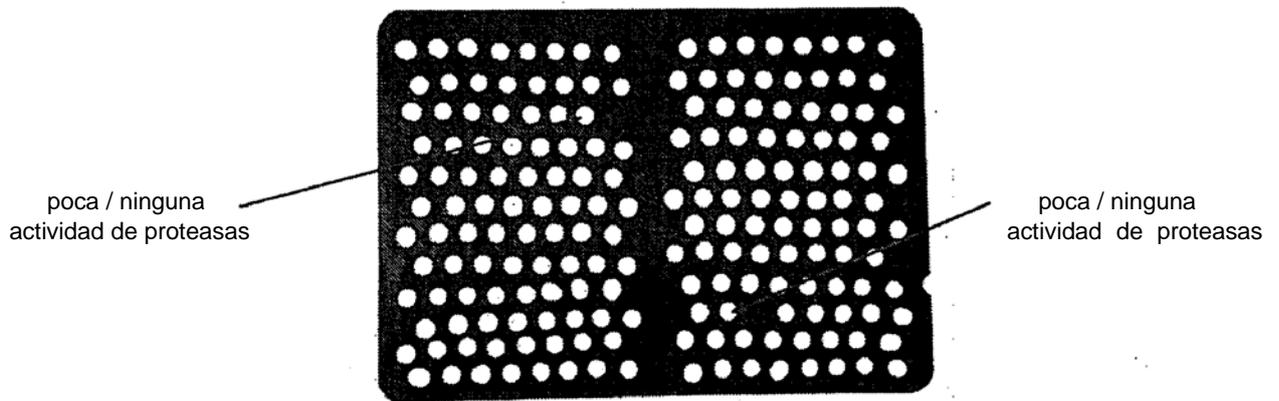


Fig.2

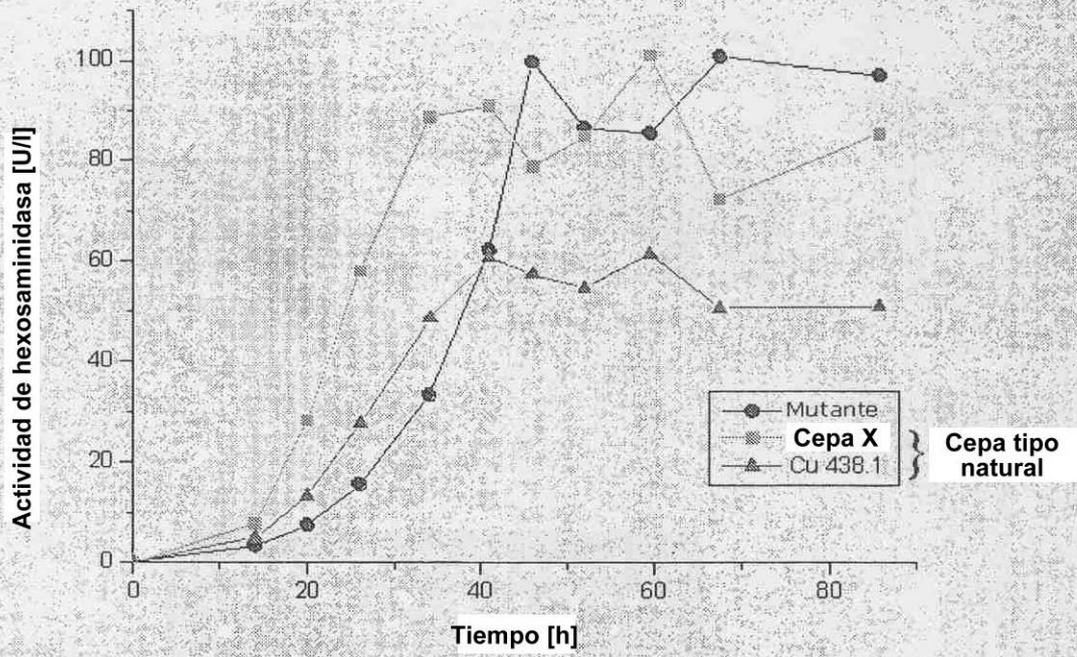


Fig.3

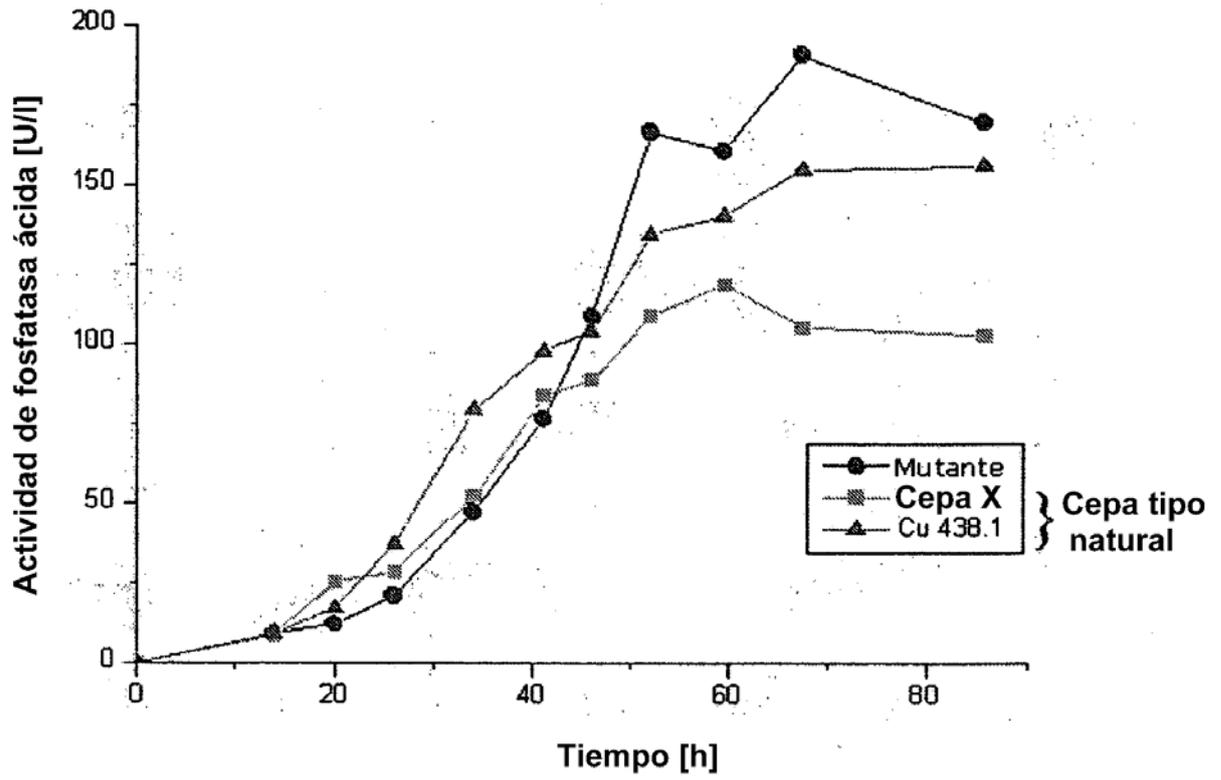


Fig.4

Fig.5

