

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 275**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2006 E 06806785 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1928997**

54 Título: **Deficiencia de dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa bifuncional en Tetrahymena y su uso**

30 Prioridad:

20.09.2005 EP 05108663

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.02.2014

73 Titular/es:

**CILIAN AG (100.0%)
JOHANN-KRANE-WEG 42
48149 MÜNSTER, DE**

72 Inventor/es:

**WEIDE, THOMAS;
BOCKAU, ULRIKE;
HERRMANN, LUTZ y
HARTMANN, MARCUS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 444 275 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

Deficiencia de dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa bifuncional en *Tetrahymena* y su uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a los campos de biología molecular recombinante, en particular al uso de una enzima marcadora bifuncional en *Tetrahymena* que permite la selección de transformandos y facilita el descubrimiento de fármacos en la investigación de parásitos protozoarios.

10

Antecedentes de la invención

Tetrahymena es un organismo unicelular eucariota que pertenece al reino *Protozoa* y que tiene dos núcleos, uno transcripcionalmente silente, el micronúcleo de línea germinal diploide (MIC) y uno transcripcionalmente activo, el macronúcleo somático poliploide (MAC). En 1923, cuando el Premio Nobel Andre Lwoff tuvo éxito en el cultivo de *Tetrahymena* en cultivo puro, puso las bases de la explotación de este alveolado como modelo. Los descubrimientos en *Tetrahymena* hechos por Milestone 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, las técnicas de biología molecular se han desarrollado como para alterar el genoma y el proteoma de *Tetrahymena*: los procedimientos de transfección de ADN comprenden entre otros la microinyección en el MAC por electroporación y bombardeo biolístico del MIC y MAC. Están disponibles plásmidos episomales basados en un replicón de ADNr, así como las técnicas knock-out/in basadas en recombinación homóloga. A nivel proteico, se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de especies relacionadas y también se han silenciado las proteínas endógenas por una nueva técnica de antisentido ribosómico. Las ventajas de la utilización de *Tetrahymena* en las aplicaciones biotecnológicas incluyen el crecimiento rápido, la alta biomasa, la fermentación en instalaciones ordinarias para bacterias/levaduras, la producción a gran escala, así como la existencia de medios baratos y definidos químicamente.

15

20

25

Hasta ahora, solamente se han descrito unos pocos marcadores que se puedan utilizar en *Tetrahymena*: las resistencias mediadas por mutación de punto ribosómica, una resistencia a la neomicina basada en un plásmido y un marcador complicado de selección de beta-tubulina que utiliza un promotor inducible en combinación con tubulinas mutadas que son resistentes/ sensibles al fármaco mitótico taxol¹. Aún no está disponible ningún marcador auxotrófico verdadero que permita la selección sin el uso de antibióticos o fármacos. Esto es lo que solicita la presente invención.

30

35

Schlichterle, I Martha y col., desvelan en *Molecular and general genetics* vol. 250, N° 6, 1996, páginas 665-673 un análisis de clonación y molecular del gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa bifuncional en el protozoario ciliado *Paramecium tetraurelia*.

40

Descripción de la invención

Las enzimas críticas en la biosíntesis de pirimidina son las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidilato sintasa (TS). La DHFR cataliza la producción de tetrahidrofolato a partir del dihidrofolato; la TS se encarga de la transferencia de un grupo metilo de N⁵. N¹⁰- metilén- tetrahidrofolato a dUMP generando de esta manera dTMP y tetrahidrofolato. Estas enzimas son cruciales para la síntesis de pirimidina y se han utilizado como marcadores auxotróficos en varios sistemas por destrucción génica dirigida, pero también se han desarrollado varios inhibidores (antifolatos) como fármacos antiparasitarios. En los animales, hongos y eubacterias el gen de la DHFR y TS se traducen por separado, mientras que en plantas, *Alveolata* y *Euglenozoa* tienen una fusión génica bifuncional que combina en una proteína las actividades de ambas enzimas ("DHFR-TS").

45

50

La existencia de la enzima bifuncional en *Tetrahymena pyriformis* se postuló en 1984² y 1985³ pero no se ha llevado a cabo ningún análisis funcional ni molecular biológico. En 2001⁴ se publicó una secuencia de aminoácidos parcial de DHFR-TS, de una "cepa similar a *T. pyriformis*" sin determinar, pero a este trabajo le falta cualquier prueba de la relación del ADNc parcial descrito con la función de la enzima.

55

La presente invención proporciona una caracterización detallada del gen DHFR-TS de *T. thermophila* incluyendo la estructura génica y los datos funcionales de la enzima incluyendo datos de la función *in vivo*. Además de un marcador auxotrófico simple que se describe por primera vez en ciliados, la combinación de estos resultados con ciertas propiedades fuera de lo común de *Tetrahymena* dan como resultado una herramienta poderosa para el desarrollo y descubrimiento de nuevos antifolatos contra los parásitos apicomplejos como por ejemplo *Plasmodium* sp. (malaria), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis) y *Cryptosporidium* sp. (criptosporidiosis).

60

Se han hecho grandes esfuerzos para luchar contra estos graves problemas en todo el mundo, dirigiéndose contra la DHFR-TS de los parásitos mencionados anteriormente con antifolatos. El éxito inicial en la lucha contra la malaria fue superado por la aparición de cepas de *Plasmodium* resistentes a los fármacos. Especialmente en el caso de la malaria, la diversidad de DHFR-TS es múltiple debido a la existencia de cepas diferentes (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P.*

65

malariae, *P. ovale*) y a la alta frecuencia de recombinación de ADN / mutaciones que producen nuevas resistencias una y otra vez. Revelando la estructura cristalina de las enzimas mutantes y por tanto DHFR-TS resistentes, se han desarrollado nuevos fármacos de molécula pequeña por modelado molecular asistido por ordenador. El problema principal es el ensayo de la eficacia de los fármacos candidatos: ya que los endoparásitos son difíciles de cultivar y tienen un ciclo vital anormalmente complejo que hace casi imposible el ensayo directo de los nuevos compuestos. Se puede dar un rodeo, utilizando el gen deficiente *dhr1* de cepas S⁵ de levaduras, que expresen la enzima funcional DHFR-TS parasitaria de interés y de esta manera reconstituir la deficiencia de *dhr1*. Sin embargo esta estrategia tiene muchas desventajas: el codón de utilización en parásitos apicomplejos, es muy diferente de todos los que se utilizan comúnmente en los sistemas de expresión como *E. coli*, levaduras y líneas celulares de mamíferos y algunos de los ARNt que se necesitan para la traducción no son abundantes en estos modelos de organismos. *Apicomplexa/Sporozoa*, pertenecen al grupo filogenético *Alveolata*, que posee varias características celulares biológicas especiales, la más notable es la presencia de alveolos corticales, vesículas aplanadas envueltas en una capa continua que sirve de soporte a la membrana. Ningún modelo de organismo descrito hasta ahora tiene esa variedad de propiedades especiales que tendrá una influencia en la absorción y virtudes de los fármacos.

Todos estos problemas mencionados anteriormente se pueden superar con el uso de *Tetrahymena*:

Pertenece a los *Alveolata* y es la especie más estrechamente relacionada con los apicomplejos. La *Tetrahymena* es capaz de crecer en medios químicos definidos sin la presencia de timidina compitiendo por una ruta funcional silvestre para la síntesis de dTMP por medio de una enzima DHFR-TS bifuncional. La deficiencia en la actividad de esta enzima debería dar líneas celulares que solo crecieran en medios suplementados con timidina. Para destruir la actividad de DHFR-TS se pueden utilizar varias técnicas comunes como por ejemplo, knockout del gen elegido, mutagénesis dirigida al sitio de aminoácidos esenciales y mutagénesis aleatoria. La selección de clones deficientes de DHFR-TS se puede llevar a cabo por replicación del cultivo en placas en medios con (T+) o sin timidina (T-). Los clones potenciales deberían crecer solamente en T+ pero no en T-. La reconstitución satisfactoria de la actividad de la enzima se puede conseguir transformando las células mencionadas anteriormente con fragmentos de ADN que codifiquen una enzima DHFR-TS funcional que produzcan las células que crezcan en T-. Este procedimiento permite la selección de transformandos sin utilizar fármacos o antibióticos. Para el caso de los exógenos, DHFR-TS recombinante que se deriva de los parásitos apicomplejos, se consigue un sistema modelo ideal para la selección de fármacos antifolato que se puede utilizar fácilmente en un sistema de alto rendimiento.

Se reivindica un procedimiento para producir una célula ciliada con actividad de dihidrofolato reductasa (DHFR) reducida o esencialmente sin actividad o actividad de timidilato sintasa (TS) reducida o esencialmente sin actividad o actividades de dihidrofolato reductasa y de timidilato sintasa (DHFR-TS) reducidas o esencialmente sin actividad, comprendiendo las etapas de

- a) transformar células ciliadas insertando una construcción que contiene un alelo que altera el gen que codifica la DHFR-TS endógena en al menos uno de los genes endógenos DHFR-TS del macronúcleo (MAC) del ciliado,
- b) inducir un proceso de mezclado alélico en las células ciliadas transformadas para generar células que tengan la construcción insertada en la mayoría de todos los genes DHFR-TS funcionales del MAC, e
- c) identificar las células generadas en la etapa b) por cultivo con y sin timidina.

El procedimiento de acuerdo con la invención también puede utilizar el hecho de que el micronúcleo (MIC) almacena la información genética para la descendencia sexual. En consecuencia el procedimiento de acuerdo con la invención también engloba que en la etapa a) la construcción que contiene el alelo que altera el gen codificante de DHFR-TS se inserta en al menos uno de los genes DHFR-TS endógenos del micronúcleo del ciliado (MIC), y en la etapa b) la células que tienen la construcción insertada en la mayoría de todos los genes DHFR-TS funcionales del MAC se generan por reproducción de las células de la etapa a) con otras células ciliadas para producir una descendencia que contiene un nuevo MAC derivado del MIC alterado.

De acuerdo con la invención puede preferirse que el ciliado sea *Tetrahymena*, preferentemente *Tetrahymena thermophila*.

El gen DHFR-TS de acuerdo con la invención puede tener una secuencia de nucleótidos según la Sec. ID N° 1.

Se puede preferir además que la región de 1,5 kb secuencia arriba y abajo del gen endógeno de la célula que codifica la enzima DHFR-TS bifuncional esté alterada.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa adicional de reconstitución de la actividad de de la DHFR-TS por transfección de las células con una molécula de ADN o ARN que codifique una enzima DHFR-TS funcional no endógena.

La expresión “no endógena” significa que la molécula de ADN o ARN está derivada de un organismo diferente, preferentemente de una especie alveolada diferente.

5 Además el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa adicional de reconstitución de la actividad de de DHFR-TS por transfección de las células con una molécula de ADN o ARN que codifique una enzima DHFR-TS funcional endógena así como otra proteína.

10 La molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS endógena o no endógena puede derivarse de un alveolado, preferentemente un ciliado, incluso más preferentemente de *Tetrahymena* y más preferentemente de *Tetrahymena thermophila*. También se puede derivar de un apicomplejo.

Además la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS funcional puede estar representada por la Sec. ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de la enzima puede estar representada por la Sec. ID N° 3.

15 La presente invención también comprende una célula ciliada con auxotrofia por la timidina. Preferentemente la célula ciliada de acuerdo con la invención tiene una actividad de DHFR reducida o no tiene esencialmente actividad o una actividad de TS reducida o no tiene esencialmente actividad o ambas actividades de DHFR-TS reducidas o no tiene esencialmente actividad. Dicha célula ciliada se puede obtener utilizando procedimientos como los que se describen en el presente documento.

20 También se desvela una célula ciliada con la actividad de DHFR-TS reconstituida, en la que la enzima DHFR-TS no es la forma endógena. Dicha célula ciliada puede obtenerse utilizando los procedimientos que se describen en el presente documento.

25 Además la presente invención engloba una célula ciliada con actividad reconstituida de DHFR-TS endógena que expresa otra proteína. Dicha célula ciliada puede obtenerse utilizando los procedimientos que se describen en el presente documento.

30 También se reivindica el uso de las células ciliadas de acuerdo con la presente invención que tienen una actividad enzimática reconstituida DHFR-TS no endógena en un ensayo para detectar compuestos químicos que afectan la actividad de la enzima DHFR-TS, que comprende las etapas de

a) poner en contacto las células con el compuesto a ensayar,

35 b) medir la actividad de la enzima DHFR-TS de las células, y

c) comparar la actividad de la enzima DHFR-TS con la actividad de la enzima DHFR-TS de las células de control.

40 Las células ciliadas de acuerdo con la invención que tienen una actividad enzimática reconstituida DHFR-TS endógena se pueden utilizar para la producción de otra proteína.

También está en el ámbito de la presente invención un ácido nucleico aislado que codifica la proteína DHFR-TS que tenga la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Sec. ID N° 1.

45 **Figura 1: Estructura genómica de la enzima DHFR-TS bifuncional de *T. thermophila***
La estructura del gen DHFR-TS de *T. thermophila* consiste en tres exones (gris) y 2 intrones (negro). Los pares cebadores para la amplificación del ADN de la integración homóloga y la amplificación del CDS o ADNc se muestran en la parte de abajo.

50 **Figura 2: pKOI: construcción knockout de DHFR-TS**
La figura 2 muestra la construcción knockout utilizada para el knockout dirigido del gen DHFR-TS en *T. thermophila*. Consiste en las regiones adyacentes 5' y 3' del gen DHFR-TS de *T. thermophila* y partes de su secuencia codificante (CDS), destruidas por un casete funcional de neomicina que confiere resistencia a la paromomicina.

55 **Figura 3: Generación de cepas deficientes en DHFR-TS por mezclado alélico.**
Las cepas silvestres se transfectaron con pKOI. En una copia de 45 ARP el gen DHFR-TS endógeno se sustituye por la construcción knockout (etapa 2). Por división amitótica del MAC y selección de clones por alta presión surgirá que se han resuelto todos los genes DHFR-TS endógenos y se retienen solamente los genes DHFR-TS recombinantes y defectuosos (etapa 3).

60 **Figura 4: Selección de células knockout DHFR-TS por crecimiento en timidina**
Las células *Tetrahymena* con gen DHFR-TS destruido (clon 1-3) no crecen sin la presencia de timidina (CDM-T), mientras que las células silvestres sí. La adición de timidina al medio (CDM+T) recupera el crecimiento.

65 **Figura 5: Crecimiento de *Tetrahymena* deficiente en DHFR-TS comparada con el tipo silvestre**

Las cinéticas de crecimiento de las células knockout DHFR-TS comparadas con las células silvestres en medios con y sin timidina muestran que la cepa knockout (pKOI) crece igual de rápido que las células silvestres en medios suplementados con timidina (CDM+T). Las células knockout mueren sin la presencia de timidina (CDM-T). Las curvas se calcularon por los valores medios de al menos tres experimentos independientes.

Figura 6: Integración apropiada de la construcción knockout DHFR-TS

Esta figura señala el método PCR para determinar que la construcción desactivada/activada estaba integrada en los locus del gen DHFR-TS.

Se ensayaron tres células diferentes: K1 es el control silvestre, K2 son células transfectadas con un plásmido que llevaba solamente los casetes destructores pero no las secuencias genéticas DHFR-TS y pKOI D_{VL} son células transformadas con el plásmido pKOI D_{VL}. PCR1 es un control de la reacción de amplificación de 369 pb del gen de la beta-hexosaminidasa. PCR2 es para detectar DHFR-TS endógeno (nótese que en las células pKOI D_{VL} el gen silvestre está aún en el MIC!). PCR3 solamente da lugar a un producto PCR para el ADN pKOI D_{VL} integrado correctamente. PCR4 muestra que se ha integrado el casete de expresión de longitud completa.

Figura 7: Función de diana desactivada de la enzima (DNasa)

Se ensayó la actividad de DNasa de los sobrenadantes de tres clones transformados por pKOI D_{VL}. Solo las células inducidas (+) mostraron actividad alta de DNasa, aunque las células no inducidas mostraron una actividad enzimática ligeramente elevada comparada con la de las células silvestres debido a la baja actividad básica del promotor.

Figura 8: Expresión de diana desactivada

Las transferencias de Western muestran la expresión de la DNasa I recombinante humana: Solo las células transformadas e inducidas (+) muestran señales fuertes debido a los anticuerpos anti-DNasa I. Se visualiza la proteína de fusión PLA₁-DNasa en el gráfico de la izquierda por las muestras de fragmentos celulares. Las bandas se producen a pesos moleculares mayores que en los controles positivos maduros y procesados. En el de la derecha, los sobrenadantes se sometieron a transferencia western; el tamaño de la proteína segregada de *Tetrahymena* compete por un proceso correcto cuando se compara con el control positivo.

Figura 9: Visión de la reconstitución de la actividad de DHFR-TS por activación

La etapa I muestra las construcciones necesarias para la recombinación homóloga en distintos genes DHFR-TS exógenos en el locus destruido del gen DHFR-TS de *Tetrahymena*. La cepa descrita en el ejemplo 1 se transfecta con estos ADN haciendo posible la selección por el medio deficiente en timidina (etapa III). Después se obtienen líneas celulares por mezclado de alelos estable (etapa IV) que se pueden utilizar en la selección de fármacos antifolato.

Figura 10: Función enzimática (lipasa endógena) de diana activada

Comparable a la Figura 6 los genes de una lipasa de ciliado endógena se combinaron con un promotor inducible y las regiones adyacentes del gen DHFR-TS de *Tetrahymena*. Posteriormente se integró la construcción en un vector de transformación (construcción llamada pKOIX_M_Lipasa) y se transformaron en *Tetrahymena*. Después de la integración homóloga de la construcción de DHFR-TS en el locus DHFR-TS de *Tetrahymena* y a continuación de la selección de los clones (comparable al procedimiento descrito en la Fig. 3-Fig. 6), se ensayó la actividad de la lipasa en los sobrenadantes de un clon transformado con pKOIX_M_Lipasa. Solamente se ensayó la actividad de la lipasa en las células que tenían pKOIX_M_Lipasa. Solamente las células que tenían la construcción pKOIX_M_Lipasa integrada, mostraron altos niveles de actividad de la lipasa. Las células silvestres mostraron un nivel bajo de actividad enzimática de lipasa debido a la baja actividad promotora del promotor de lipasa endógeno. El gráfico inferior muestra la construcción integrante en toda su longitud. La Figura 10 muestra la actividad de la lipasa en el sobrenadante de células silvestres y transformantes inducidos, medida con un ensayo enzimático de lipasa Reflectoquant[®] de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Figura 11:

La figura 11 muestra la construcción del casete de longitud total de integración/expresión para la lipasa (pKOIX_M_Lipasa), que se transformó en las células de *Tetrahymena* con el fin de obtener la sobre-expresión de Lipasa endógena de ciliados.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar las realizaciones de la presente invención, pero no pretenden limitar su ámbito.

Células y cultivo celular

Las cepas de *Tetrahymena thermophila* B 1868.7 y B 2068.1 fueron amablemente proporcionadas por Peter J. Bruns y se cultivaron en medio de leche desnatada (2 % de leche desnatada, 0,5 % de extracto de levadura, 0,1 % de solución quelada de sulfato ferroso y 1 % de glucosa), en medio SPP o en CDM.

5 Amplificación del gen DHFR-TS de *T. thermophila*

El ADNc del gen DHFR-TS y sus sitios adyacentes 5' y 3' se pueden amplificar utilizando los siguientes pares cebadores. Los nucleótidos en minúscula codifican sitios de restricción de endonucleasas.

10 Amplificación de la región adyacente 5' de DHFR-TS:

DHFR 5'1 F NotI: 5'-cccgcggccgcACAGAGTTAATGGAAATGGAGC-3',

15 DHFR 5'2 R BamHI: 5'-gggggatccATATTTAAGCGATCTTCAATGG-3;

Amplificación del ADNc DHFR-TS y el gen con intrones:

DHFR CDS F: 5'-cgcGAATTCATGAAAACAAGACATTTTGTATAGTT'TTAGC-3',

20 DHFR CDS R: 5'-gcgCTCGAGTCAGACAGCCATTTTCATTTATATTTTAGGG-3',

Amplificación de la región adyacente 3' de DHFR-TS:

25 DHFR 3'1 F XhoI: 5'-gggctcgagATGCTCATGTTTACTCTAATCACG-3',

DHFR 3'1 R Acc65I: 5'-gggggtaccAGTAAAAATAGAGTAGAAGGAG-3'.

Construcción de plásmidos

30 El plásmido pKOI (desactivación/activación) se construyó como sigue: Como estructura se utilizó el plásmido pBS II SK, para la selección y propagación en *E. coli*. Se amplificó el sitio 5'-DHFR-TS de integración de 1,5 kb utilizando el par cebador DHFR 5' F NotI y DHFR 5' 2 R BamHI clonados en el pBS II SK utilizando los sitios NotI y BamHI. Luego se clonó el casete de selección de 1,4 kb de la paromomicina del pH4T2 (neo2) en el pBS II SK intermediario por medio de los sitios BamHI y SmaI. Finalmente el sitio de integración 3' DHFR-TS se amplificó con los cebadores DHFR 3' 1 F XhoI y DHFR 3' 1 R Acc65I y se clonó utilizando los sitios XhoI y Acc65I para finalizar el casete DHFR-TS desactivado.

40 El sitio SacI de la estructura del pBS II SK se había destruido por mutagénesis dirigida al sitio para facilitar el uso del sitio SacI endógeno en la secuencia integrante DHFR-TS 3' y el sitio XhoI como sitio único de clonación en el pKOI. Estos sitios se utilizaron para insertar casetes para la expresión de enzimas recombinantes (activación). En este estudio utilizamos un casete de expresión/secreción de DNasa I humana recombinante y un casete de expresión/secreción de lipasa de ciliados endógena. Para la DNasa consiste en los primeros 115 aa del precursor PLA₁ endógeno y los aa 23-281 de la DNasa I humana madura. Para asegurar la traducción apropiada de esta proteína de fusión se utilizó un codón sintético optimizado del gen DNasa I humano. La expresión se controló por el promotor inducible MTT-1 descrito anteriormente, la terminación se reguló por el terminador BTU2, como en el casete neo2 de pH4T2⁷.

Transformación de plásmidos pKOI (bombardeo biolístico)

50 Utilizamos células de conjugación en crecimiento, así como vegetativas, y no conjugadas estacionarias de cepas de *T. thermophila*. La transformación de las células de *T. thermophila* se llevó a cabo como describió anteriormente Gaertig y col.⁸

Ensayo de selección, mezclado alélico y desactivación de DHFR-TS

55 Ensayo de proliferación celular de *T. thermophila*: En primer lugar circ. 16 h tras el bombardeo biolístico los transformantes se cultivaron en el medio de leche desnatada. Después las células transformadas se cultivaron en el medio SPP con concentraciones crecientes de paromomicina (de 100 µg/ml a 1000 µg/ml) para apoyar el proceso de mezclado alélico. Tras 3-4 semanas cada clon se cultivó en placas de replicación CDM con y sin timidina (10 mg/ml). Los clones desactivados DHFR-TS funcionales son los únicos capaces de crecer en el medio CDM suplementado con timidina. La viabilidad de las cepas desactivadas de DHFR-TS se controló determinando la cinética de crecimiento (Figura 5).

65 La ausencia del gen endógeno DHFR-TS del tipo silvestre en el MAC así como la completa integración del DHFR-TS desactivado y la DNasa I rh desactivada en el casete se confirmó por PCR utilizando los siguientes cebadores:

DHFR01F: 5'-CTTTTAAACAGCCTGCTGCTCG-3',

DHFR02R: 5'-GATTTTGATGCTTCAATAAGGTTG-3',

5 DHFR03F: 5'-TTATTTGTTTTATCATAGTGGAAAAGG-3',

DHFR04R: 5'-CAGACACCTCAATCATATCAAAG-3',

DHFR05F: 5'-GGTCCTCCATCAGATTGTGG-3'

10 DHFR06R: 5'-CGCGTCGAGTCAGACAGCCATTTTCATTTA-3'

Hex01F: 5'-ATGCAAAAGATACTTTTAATTACTTTC-3'

15 Hex02R: 5'-TATATTTTAGGAATGTTGTAATC-3'

Se utilizó un plásmido pH4T2 que llevaba los mismos casetes de expresión/secreción neo2 y DNasa I como control de la PCR. El método PCR se ilustra en la Figura 6.

20 SDS-PAGE y transferencia Western

Se resuspendieron alícuotas de las células transformadas y sobrenadantes SPP en un tampón de ensayo y se separaron en SDS-PAGE al 15 %. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon en PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20 y un 5 % de leche desnatada (PBS-TM). Se detectó la expresión de DNasa I recombinante humana en los ciliados transformados por dos antisueros específicos de conejo contra DNasa I humana (antígeno: DNasa I recombinante humana, Pulmozyme, Roche). Ambos sueros detectaron el antígeno DNasa I recombinante. El suero se utilizó en una dilución 1:500 en PBS-TM. Después del lavado con PBS/T se aplicó un suero anticonejo conjugado con HRP. Se desarrollaron las transferencias utilizando quimioluminiscencia.

30 Ensayo de la actividad de DNasa I

Se llevó a cabo en ensayo de actividad de la DNasa basado en el verde de metilo como ya se ha publicado⁹. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h en una placa microtiter. Se midió la absorbancia a 620 nm. Se consiguió la calibración del ensayo con diferentes cantidades de Unidades definidas de DNasa de Pulmozyme de Roche (derivado CHO) en cada experimento y la regresión lineal. Estos resultados combinados con transferencia de western semi-cuantitativa se utilizaron para calcular la actividad específica de la DNasa I que se había expresado.

Ensayo de la actividad de lipasa

40 Se llevó a cabo el ensayo de actividad de la Lipasa (tiras de ensayo Reflectoquant[®] con el Reflectómetro RQflex[®]) según las instrucciones del fabricante (VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt, Alemania, número de artículo: 1.05851.0001).

Ejemplo 1: Generación de heterocariones auxotróficos

45 El protozoo *T. thermophila* pertenece a los ciliados. Estos eucariotas constan de dos núcleos, un macronúcleo somático (MAC) y el micronúcleo genético (MIC). El MIC es el núcleo de la línea germinal, es decir, guarda la información genética para la descendencia sexual. El MIC es diploide y contiene cinco pares de cromosomas. Por el contrario, el MAC es el núcleo somático y no se transmite ningún ADN MAC a la descendencia sexual. El MAC contiene 200-300 piezas replicantes autónomas (ARP) que se derivan del MIC. Cada una de estas unidades está presente en aproximadamente 45 copias excepto en el gen del ADNr que está amplificado independientemente a circ. 10.000 por célula. El ADN MAC es el ADN transcrito y por tanto es el responsable del fenotipo presente de las células de *T. thermophila*.

55 Es obvio que la manipulación genética en último término necesita la transformación del MAC funcional que es el que se encarga de la expresión proteica. Las primeras estrategias de expresión heteróloga se hicieron usando plásmidos que utilizan la enorme amplificación del gen del ADNr durante el desarrollo del MAC. Sin embargo la presencia episómica de estos plásmidos depende de la concentración del fármaco y el plásmido puede recombinarse homológamente y no direccionalmente en unidades endógenas de ADNr.

60 La forma más prometedora es la transformación estable de las células. Esto significa la integración estable de los casetes de expresión en el MAC y/o el MIC de *T. thermophila*. Se puede conseguir la transformación del MIC por transformación estable del ADN cromosómico del MIC diploide. Después de la conjugación de dos diferentes tipos de emparejamiento desaparece el antiguo MAC de las células que se conjugan y se construyen nuevos MAC en la progenie derivados de los MIC recombinantes que llevan la nueva información. Todo el proceso sigue las estadísticas de la genética Mendeliana. La ventaja de esta estrategia es que se obtienen clones estables que

mantienen las propiedades genéticas y que se pueden cruzar por medio de la genética clásica para combinar varias propiedades de diferentes cepas de *T. thermophila*. Esta estrategia es muy elaborada y consume mucho tiempo. Además, se ha demostrado recientemente que los ARN scan derivados del antiguo MAC tienen un papel importante en la eliminación de ADN durante el desarrollo del MAC somático a partir de la línea germinal MIC. La secuencia primaria de estos pequeños ARN explica como el MAC parental controla epigenéticamente la reordenación del genoma en el nuevo MAC. En el caso de transformantes estables MIC este mecanismo similar a ARNi inhibe el establecimiento y mantenimiento de los casetes de expresión ajenos en el nuevo MAC en desarrollo.

En lugar de una transformación episómica por plásmidos basados en ADNr o la transformación estable del MIC se utilizó un atajo por la combinación de una transformación del MAC estable con una estrategia inmediata de mezclado alélico. Esta combinación tiene varias ventajas. En primer lugar, la transformación del MAC es mucho más eficaz porque hay al menos aproximadamente 45 sitios de integración potencial por locus génico. En segundo lugar, no solo se pueden transformar cepas conjugadas sino también no conjugadas, y por tanto definidas. Finalmente, las recolocaciones del genoma informadas recientemente en el MAC en desarrollo que están reguladas por mecanismos de ARN scan se pueden atajar por transformación MAC combinada con mezclado alélico.

Para llevar a cabo los experimentos de desactivación/activación se amplificaron el gen DHFR-TS de *T. thermophila* y sus regiones adyacentes utilizando los pares cebadores DHFR 5'1 F Not, DHFR 5'2 R BamHI para la región 5' región no codificante, el par cebador 3'1 F XhoI, DHFR 3'1 R Acc65I para la región 3' y los cebadores DHFR CDS F, DHFR CDS R para la amplificación de la región codificante. La comparación de la región codificante de la estructura génica DHFR-TS con el ADNc DHFR-TS (amplificado por el mismo par cebador DHFR CDS F/R), reveló la arquitectura exón-intrón de la estructura (Figura 1).

Para empezar los experimentos de desactivación se construyó el plásmido pKOI (Figura 2). Se utilizó el casete neo2 de pH4T2 para controlar la entrada del plásmido con éxito por selección contra la paromomicina. El casete neo2 de pKOI está flanqueado por los fragmentos de 1,5 kb de la región 5' y 3' de las regiones no codificantes del gen DHFR-TS, respectivamente (Figura 2). Debido a que el pKOI carece de un origen apropiado para la replicación, los clones resistentes a la paromomicina de *T. thermophila* competían por un evento de recombinación homóloga apropiado en el locus génico DHFR-TS. Sin embargo, la prueba más convincente de la integración correcta en el locus DHFR-TS es la pérdida de la actividad de DHFR-TS en la cepa transformada. En el caso de los ciliados para esto se necesita reemplazar completamente todos los alelos cromosómicos DHFR-TS del tipo silvestre (~45 ARP) por las ARP que incluye el casete desactivado. Nosotros lo conseguimos por mezclado alélico. Este mezclado alélico o fenotípico se basa en la distribución al azar de las unidades cromosómicas del MAC (ARP) durante la mitosis. Con el fin de forzar el proceso de mezclado en la dirección deseada – concretamente del gen de resistencia recombinante – las células transformadas se cultivaron durante al menos 2-3 semanas utilizando concentraciones crecientes del fármaco paromomicina. Los clones simples se aislaron y se ensayaron para ver la deficiencia de DHFR-TS utilizando un medio químico mínimo determinado (CDM) con (+T) y sin timidina (-T). En la Figura 4 y la Figura 5 se demuestra que los clones DHFR-TS desactivados descubiertos son cepas realmente auxotróficas: los mutantes son capaces de crecer en CDM con timidina como las cepas silvestres o las cepas con un mezclado alélico incompleta. En CDM carente de timidina no son capaces de crecer (véase la Figura 4 y la Figura 5).

Ejemplo 2: Desactivación DHFR-TS para activar el gen de interés

La desactivación del gen endógeno DHFR-TS de *T. thermophila* también proporciona la posibilidad de la activación de un gen ajeno más que se puede expresar heterológamente en las cepas DHFR-TS desactivadas. Para este fin se construyó el plásmido pKOI D_{VL}. Este consiste en la estructura del pKOI con un casete de expresión adicional que codifica los primeros 115 aminoácidos (aa) de la secuencia precursora del gen PLA₁ y la DNasa I madura humana (aminoácidos 23 a 281). La construcción para la expresión de la lipasa endógena contiene la secuencia del péptido prepro-lipasa de ciliados-endógeno y la lipasa de ciliados endógena madura.

El péptido prepro PLA₁ (aa 1 a 110) tiene una similitud significativa con los miembros de la familia de la catepsina L e interviene en la secreción al medio. Igual que el péptido prepro PLA₁ el péptido prepro de lipasa de ciliados endógena interviene en la secreción de lipasa al medio.

En el caso de la DNasa los cinco aminoácidos adicionales (aa 111 a 115) deberían asegurar una escisión óptima de la proteína de fusión PLA₁-DNasa I por propeptidasas endógenas. Por el contrario el casete de expresión neo2 de la proteína de fusión ppPLA₁₁₅-DNasa está regulado por el promotor inducible MTT1. Se seleccionó el sistema inducible porque permite una discriminación clara entre la actividad de DNasa de la DNasa I recombinante humana expresada heterológamente y la actividad basal que se debe al menos a dos DNasas endógenas. De acuerdo con esto el sistema inducible se seleccionó también en el caso de la lipasa porque permite una discriminación clara entre el nivel basal de la actividad de la lipasa endógena y la actividad de la lipasa endógena homóloga sobre-expresada. La transformación, selección de los clones positivos y el mezclado alélico dirigido se hicieron como se expone en el ejemplo 1. Además la integración correcta y completa de ambos casetes de expresión (neo2 y el DNasa I) en el locus DHFR-TS se ensayó con un método PCR. La Figura 6 muestra que este es el caso.

Con el fin de demostrar el concepto pKOI, las células de estas cepas desactivadas DHFR-TS que tenían el casete de expresión ppPLA115-DNasa se trataron con y sin Cadmio. Solo las cepas inducidas mostraron una actividad de DNasa elevada en el sobrenadante (Figura 7). Para confirmar estos datos enzimáticos se utilizó un antisuero específico contra DNasa I humana para analizar los extractos celulares y el sobrenadante de estas cepas desactivadas DHFR-TS que expresan DNasa humana por transferencia de western. Los resultados ilustran que las cepas desactivadas DHFR-TS eran capaces de expresar y segregar la proteína recombinante humana funcional (Figura 8).

Ejemplo 3: Reconstitución recombinante de la actividad de DHFR-TS para crear cepas de selección de alta producción de antifolatos

La reconstitución de la actividad de DHFR-TS en las cepas de *Tetrahymena* deficientes en DHFR-TS se puede hacer por expresión heteróloga de las enzimas DHFR-TS bifuncionales de otros *Alveolata*. Como ya se mencionó en la introducción, este grupo filogenético consiste en *Ciliata*, *Dinoflagellata* y *Apicomplexa* / *Sporozoa*. Especialmente los *Apicomplexa* son de alto interés médico debido a que todos sus miembros son parásitos intracelulares y algunos de ellos causan enfermedades muy graves (malaria, toxoplasmosis, criptosporidiosis).

Aparte del hecho de que las cepas de *T. thermophila* deficientes en DHFR-TS en combinación con un plásmido/vector DHFR-TS proporcionan un nuevo marcador para la biología molecular, el mismo sistema se puede utilizar para generar cepas de ensayo definidas para aplicaciones de desarrollo de fármacos. Debido a la estrecha relación filogenética también es posible recuperar la actividad de DHFR-TS en cepas deficientes de *Tetrahymena* con enzimas DHFR-TS de otros miembros del grupo *Alveolata*. Esto implica la aplicación de cepas de *T. thermophila* deficientes en DHFR-TS en la búsqueda y ensayos de nuevos fármacos anti DHFR-TS (antifolatos). Esto es de gran importancia porque los antifolatos han sido unos de los fármacos más prometedores en la lucha contra la malaria. El hecho de que los fármacos anti-DHFR-TS se hayan administrado durante mucho tiempo a, por ejemplo, pacientes de malaria, es la razón de que durante las últimas décadas muchos de estos parásitos se hayan hecho resistentes. A día de hoy se están explorando muchas estrategias para encontrar nuevos fármacos más específicos y eficaces contra la enzima DHFR-TS del parásito. Como la investigación de nuevos folatos se basa en la determinación de la estructura utilizando técnicas NMR y de cristalización, la mayoría de estas estrategias son muy costosas en tiempo y dinero.

Las cepas de *T. thermophila* deficientes en DHFR-TS que expresan una DHFR-TS parasitaria activa, no solo son capaces de crecer en un medio carente de timidina, sino que también son adecuadas para buscar nuevos antifolatos. Por tanto las cepas deficientes en DHFR-TS recuperadas por la bienzima homóloga de los parásitos representa un sistema de ensayo *in vivo* simple y flexible conferible a otras enfermedades producidas por parásitos del grupo *Apicomplexa*. Por ejemplo, no se han considerado los antifolatos contra cepas de *Plasmodium vivax* porque no estaba disponible un sistema de ensayo *in vivo* apropiado y flexible para una estrategia de producción de alto rendimiento. Esto se puede hacer fácilmente por recuperación de la actividad de DHFR-TS de cepas de *T. thermophila* utilizando las bienzimas homólogas de *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* así como enzimas de *Apicomplexa* / *Sporozoa* que causan toxoplasmosis y criptosporidiosis. La Figura 9 ilustra este concepto. Se utilizó la enzima DHFR-TS de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensible a la pirimetamina para recuperar la actividad de DHFR-TS en una cepa de *T. thermophila* que carecía de actividad de DHFR-TS. En paralelo, se ha ensayado una DHFR-TS de una cepa de *Plasmodium falciparum* que es resistente al tratamiento con pirimetamina (por ejemplo el mutante S108N DHFR-TS). Midiendo el efecto de la pirimetamina en unas curvas de dosis respuesta de los dos transformandos distintos se puede determinar fácilmente la resistencia y la sensibilidad al fármaco. Posteriormente se pueden añadir nuevos fármacos potenciales al medio para mostrar su efectividad en mutantes DHFR-TS que ya son resistentes.

Lista de referencias

1. Gaertig, J., Thatcher, T. H., Gu, L. y 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).
2. Garrett, C. E. y col. A bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase in protozoa. Mol. Biochem. Parasitol. 11, 257-265 (1984).
3. Kotsifaki, H., Kapoulas, V. y Deliconstantinos, G. Targeting of liposomes containing methotrexate towards *Tetrahymena pyriformis* cells. Gen. Pharmacol. 16, 573-577 (1985).
4. Stechmann, A. y Cavalier-Smith, T. Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion. Science 297, 89-91 (2002).
5. Hastings, M. D. y Sibley, C. H. Pyrimethamine and WR99210 exert opposing selection on dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 13137-13141 (2002).

6. Shang, Y. y col. 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).

5 7. Gaertig, J., Gu, L., Hai, B. y Gorovsky, M. A. High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. Nucleic Acids Res. 22, 5391-5398 (1994).

10 8. Gaertig, J. y Gorovsky, M. A. DNA-mediated transformation in *Tetrahymena*. Methods Cell Biol. 47, 559-569 (1995).

9. Sinicropi, D., Baker, D. L., Prince, W. S., Shiffer, K. y Shak, S. Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate. Anal. Biochem. 222, 351-358 (1994).

15 SECUENCIAS

Sec ID 1:

<110> Cilian AG
 <120> Deficiencia de dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa bifuncional en Tetrahymena y su uso
 20 <130>
 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 4556
 25 <212> ADN
 <213> *Tetrahymena thermophila*
 <220>
 <221> Intrón
 <222> (1761)..(1839)
 30 <223>
 <220>
 <221> Intrón
 <222> (2191)..(2302)
 <223>
 35 <220>
 <221> CDS1
 <222> (1346)..(1760)
 <223>
 <220>
 40 <221> CDS2
 <222> (1840) .. (2190)
 <223>
 <220>
 45 <221> CDS3
 <222> (2303)..(2994)
 <223>
 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> <(1)..(1760)
 50 <223>
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222>(2995)..(4556)
 <223>
 55 <400> 1

ES 2 444 275 T3

```

acagagttaa tggaaatgga gctatgattg teagtccttc tegtgttctt cagagaggtg      60
gtgctattgg aactagacag aacttacctg atactatgta gcataatttc gctacaaaac      120
atataatata acagcccacg acagtagaag atttgcaaag aatggaagaa atataaagaa      180
atatagaaaa cgaaaacca: atttatagta ataataccca taataatata gaaaaaccag      240
agaaatgaaa ttaggaaatcg cgagtaaacct aagttcctac tttccataaa aacaactaat      300
tttaataaaa caacatttc: gataaaaaaa aatgagctaa ttgacaacct cgcctatcta      360
caaacaaata agttgtatta gctaattatt ctttacttac tcttcacta aaatttaat      420
ctaataaata aatttatata atcaaaaaca attttcttga tctgaagtaa atagcatgtc      480
cgccacctc: aaaaataatc aaaaataaaa atacaataaa ttaagcaaa ttcaaaaaaa      540
ttcttaaaaa aaqaatqaa tqaatqaatg aaqatqgata caaaqageta tcaaaaaaga      600
aataactaa: agaataatt: attaaaatct ataaaatcat agatcaatt ccagtttttt      660
tcttctacga aagtgaag: tagttttata agattgatag aaagaattt gtatcatta      720
gcattaaaa: agaattaaga tcttctaaga tattcctat ccttacctta tactctctt      780
ttactaata: acctataata aataacatct acttaataat ttatgatact ccttttatte      840
aaaattatta actaaaataa aaatttatta cagaaatctt acttttaaat tctaaaagtt      900
aagcttctaa ttactattaa ataaataaat aatataatatt tatctgtat tttgtaaaaa      960
tatttcact: ttattgca: tteagttcat tctattatt catttctata cttttgeta      1020
ttaacttaa: aaaaatata: ttatactatg aaaaatctt ttgttaagtt gagagaattt      1080
aattctttt: ataaaaatc tatcttgaga ttactctagt atcatctaaa aatcaaaaat      1140
agctattta: aatttattgg cgcaatcctt aaaagatcgc gggattattg aatcaactaa      1200
tcattcactg gcttgcatcg cttaactttg aatttagctt atataccgc tatatttta      1260
caaatcaaa: ttttaattt: aaaaataagtg aaaaataaat tgaaaataaa aatagaattt      1320
taacaaataa acagactcag tataaatgaa aacaagacat tttagatag ttttagctta      1380
gactttaaaa aaatagggta taggttataa gaacagttta ccatggagac tacttaatga      1440

```

ES 2 444 275 T3

gcttaaaaac tttaaaaaaa taactacaga aactaagaac aaaggcctat aaaacgctgt 1500
 tatcatgggt aaaaataact ggggaagcact acctaaaaag caataaccat tgaagatcg 1560
 cttaaaatat gttatttcca ctactatgca agaggggtaa attgcagatc attcctacgc 1620
 ctgtaaaagc ttgagttctg ctttaaaact tttagaatag taaaaataa tataagatgc 1680
 ccttgtaat ggaggagcta aactttgcc aataagcatta agcgaacaga gacttagata 1740
 gattcatcta acaagagtag gtcagtagaa ttaaaattat taataacttt cttttatga 1800
 acaaaaagaga taattaata acttttcaaa aatatatagg tgcagaagt gagtgcgatg 1860
 tttttatgca aaaggactac ttaaaaaact ttgatatgat tgagggtct gaaactaaa 1920
 gcgaaaataa tttaaatta gattttacta ggtatttaa taagaattat aaaggataag 1980
 ttgaccttc tctctttaag aaaatgtaca agcctcatca agaatattaa tacttagaac 2040
 ttatcgatga aattataaag aatggacatg ttaaaacaga cagaactgga actggtacaa 2100
 tttctcagt tggcaagtgg atgagatttg acttaacaaa gaggtttctc ctgctacta 2160
 ccaaaaatg tttttggaga ggtgtagtag aagtaataaa tatattatt tattttataa 2220
 tttatagtt gatagattta aaaatgaeat ttagtctgat ttttagtga ataaaataa 2280
 taactataa atataaatta ataggaactt atttggtta tcaaaaggcag tacaacacagc 2340
 aaaaacttt cgaaaaaag aqtaaaaata tggqacqqt atggcagcag aqaatttta 2400
 gattaattag gctttaaaaa cagagaagaa ggagatttag gtcctgttta tggtttctaa 2460
 tggagacac tcggtgctga atataaagat atgcacaaa attataaagg taaagggtgc 2520
 gaccagcttc aagatttaa taacacaata aagaaaaatc ctgacagcag aaggatgatt 2580
 etgaaatgccc ggaatgttaa agatetaaca ttgatggctt taacctctg tcatgctatg 2640
 agctagttt atgtaastga taataaacta agctgatga tgtactaag atcttctgat 2700
 atgggtttag gaataccat taatataccc agttatgctt tattgactca tatgaaagct 2760
 taagtcacta atatgtaag tggagagttt atacatgttc taggtgatgc tcatgttac 2820
 tctaactcag tagattaac aaaaatttaa ttagaagag ctccataccc ctctcctct 2880
 ttaaaaatta ataacaacaa gtaatataac tctatggaag acttcaactc tgaagattc 2940
 gaattaatg gatacaacta tcaccctaaa atataaataa aaatggctgt ctgaaatgat 3000
 taaagactta tatattttgg ataactttac tactaaaata cttaactact taaatggtta 3060
 tatacaataa atctatctta ataagctatt ttaaaattta aatcaatgt tcaatcttt 3120
 attttataaa ctttcaaatc attatcaagc aaattttaa taaatatttt tttttatct 3180
 atgtttgaa tttgttccag cctgaatggc atagagctaa gtaattgtaa agttgaaaca 3240
 ttaaaactca aaattcaata gaaaatttgg aaaaagaatt ttttatttag ttagaataa 3300
 acaaaatta ttatataat ttttatagtt gattgatata tttattatt taattcata 3360
 ttttagagtga gcataatct aggcacttta aaagcgaagc tctaaataat tttagatttt 3420
 atttgaaatc ttatatteta aaaatattaa atattattgt agaaaataga atttaattac 3480
 tgaataggca tctttataga ttataatttt ctaaaacttc tgatttqtt tgataatct 3540
 attaaatga cataatttac ctaattatgt ctataaatag agtaaaaata tcatcttta 3600
 egagtaataa tttactataa gtcactatct aatccaacta aacttggtaa tttctcaaa 3660
 ttttcaataa gttcttatac ttaactcatt cctaaatggc aattactaat tattattttg 3720
 taatgaaa taatatabata taataaaatc actaaataat ttacctaaa cctaaattta 3780
 aatattttaa acagctgaa tgagttagta tagaagctat cgacaaaaca cattcttac 3840
 atccaatat atcactgttg ttttatattt tataaattaa ataaaaatct tataaaaaca 3900
 ttaatttaa tttactctaa attaaattat agtttattta attgataaa tctacatagc 3960
 tactctttaa aagcctgtgc ataactagtg cctatataat tataacctc aataattaa 4020
 tttttagtaa ttataattaa ataagaattt actataattg aagggtagg tttctaatag 4080
 actaaaatc ggtaagtcga tttatgatat tattcaatga tttctaggag agagaacatt 4140
 tacttaataa tatttaacag attaatttta aatcttttt aaaaaattct actttaatga 4200
 taagtttaa tcagatagc acttacagaa attaactgtg tttatgaca attctaat 4260
 aattctatc ttatttccac taatttaata aaaaaataq ctaaaaataa aattttat 4320
 taaaaaatc atactcaaaa actagttcta gctttttaa gctttaaat tcaactaaat 4380
 attcaaatc ttaagatata tctccttcta ctctaattt acttaataga ataatttta 4440
 tatcataac cttaaaaac aaaattacct caaaaaaac gttagatttt caagaattg 4500
 attttattt agcttcaaaa aaaagtatta aagcctctct ttgcttattt aattgt 4556

Sec ID 2:

- <210> 2
- 5 <211> 1458
- <212> ADN
- <213> *Tetrahymena thermophile*
- <400> 2

atgaaaaca gacattttga tatagtttta gcttagactt taaaaaata gggtataggt 60
 tataagaaca gttttaccatg gagactacct aatgagctta aaaactttta aaaaataact 120
 acagaaaacta agaacaagg cctataaac gctgtatca tgggtaaaaa tacttgggaa 180
 gcactaccta aaaagcaata accattgaaa gatcgttaa atattgttat ttccactact 240
 atgcaagagg ggtaaatgac agatcattcc tacgctgta aaagcctaga ttctgcttta 300
 aactttttag aatagtazaa ttaaatataa gatgcccttg taattggagg agctaaactt 360
 tgccaataag cattaagcga tcagagactt agatagattc atctaaceag agtaggtgct 420

ES 2 444 275 T3

```

gaagttgag: gcgatgttt: tatgcaaaag gactacttaa aaaacittga tatgatgag 480
gtgtctgaaa cttaaagcga aaataattta aattaagatt ttaactaggta ttttaataag 540
aattataaag gataagttga cctttctctc ttttaagaaaa tgtacaagcc tcatcaagaa 600
tattaatac: tagaactta: cgatgaaatt ataaagaatg gacatgttaa aacagacaga 660
actggaactg gtacaatttc tcagtttggc aagttgatga gatttgactt atcaaagagt 720
tttctctgctc ttactacca aaatgttttt tggagaggtg tagtagagga acttaittgg 780
tttatcaaaq gcagfaccaa cagcaaaaata ctttcagaaa aaggagttaa aatattggac 840
ggtaatggca gcagagaat: tttagattaa ttaggcttta aaaacagaga agaaggagat 900
ttaggtoctg tttatgggtt: ctaatggaga caottcggtg ctgaatataa agatatgcat 960
acaaattata aaggtaaagg tgtcgaccag cttcaagatt taattaacac aataaagaaa 1020
aatcctgaca gcagaaggat: gattatgeat gcttggaaatg ttaaagatct accatgatg 1080
gctttacctc cttgtcatg: catgagctag ttttaagtaa atgataataa actaagctgt 1140
atgatgtacc aaagatcttg tgatattggt tttaggaatac cattaatat agccagttat 1200
gctttattga ctcatatga: agcttaagtc actaaatgt aagttggaga gtttaacat 1260
gttctaggtg atgctcatg: ttactctaat caogtagatt aactaaaaat ttaattagaa 1320
aqagctcca: accccttccc tcttttaaaa attaa-aaca acaagtaata taactctatt 1380
gaagacttca ctcttgaaga ttttgaatta attggatata actatcaacc taaaaataa 1440
atgaaaatgg ctgtctga 1458
    
```

Sec ID 3:

<210> 3

5 <211> 485

<212> PRT

<213> *Tetrahymena thermophila*

<400> 3

```

Met Lys Thr Arg His Phe Asp Ile Val Leu Ala Gln Thr Leu Lys Lys
1 5 10 15
Gln Gly Ile Gly Tyr Lys Asn Ser Leu Pro Trp Arg Leu Pro Asn Glu
20 25 30
Leu Lys Asn Phe Lys Lys Ile Thr Thr Glu Thr Lys Asn Lys Gly Leu
35 40 45
Gln Asn Ala Val Ile Met Gly Lys Asn Thr Trp Glu Ala Leu Pro Lys
50 55 60
Lys Gln Gln Pro Leu Lys Asp Arg Leu Asn Ile Val Ile Ser Thr Thr
65 70 75 80
Met Gln Glu Gly Gln Ile Ala Asp His Ser Tyr Ala Cys Lys Ser Leu
85 90 95
Asp Ser Ala Leu Asn Phe Leu Glu Gln Gln Asn Gln Ile Gln Asp Ala
100 105 110
Leu Val Ile Gly Gly Ala Lys Leu Cys Gln Gln Ala Leu Ser Asp Gln
115 120 125
Arg Leu Arg Gln Ile His Leu Thr Arg Val Gly Val Glu Val Glu Cys
130 135 140
Asp Val Phe Met Gln Lys Asp Tyr Leu Lys Asn Phe Asp Met Ile Glu
145 150 155 160
Val Ser Glu Thr Gln Ser Glu Asn Asn Leu Asn Tyr Asp Phe Thr Arg
165 170 175
Tyr Phe Asn Lys Asn Tyr Lys Gly Gln Val Asp Pro Ser Leu Phe Lys
180 185 190
Lys Met Tyr Lys Pro His Gln Glu Tyr Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Asp
195 200 205
Glu Ile Ile Lys Asn Gly His Val Lys Thr Asp Arg Thr Gly Thr Gly
210 215 220
    
```

ES 2 444 275 T3

Thr Ile Ser Gln Phe Gly Lys Leu Met Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ser
 225 230 235 240
 Phe Pro Leu Leu Thr Thr Lys Asn Val Phe Trp Arg Gly Val Val Glu
 245 250 255
 Glu Leu Ile Trp Phe Ile Lys Gly Ser Thr Asn Ser Lys Ile Leu Ser
 260 265 270
 Glu Lys Gly Val Lys Ile Trp Asp Gly Asn Gly Ser Arg Glu Phe Leu
 275 280 285
 Asp Gln Leu Gly Phe Lys Asn Arg Glu Glu Gly Asp Leu Gly Pro Val
 290 295 300
 Tyr Gly Phe Gln Trp Arg His Phe Gly Ala Glu Tyr Lys Asp Met His
 305 310 315 320
 Thr Asn Tyr Lys Gly Lys Gly Val Asp Gln Leu Gln Asp Leu Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ile Lys Lys Asn Pro Asp Ser Arg Arg Met Ile Met Asn Ala Trp
 340 345 350
 Asn Val Lys Asp Leu Pro Leu Met Ala Leu Pro Pro Cys His Val Met
 355 360 365
 Ser Gln Phe Tyr Val Asn Asp Asn Lys Leu Ser Cys Met Met Tyr Gln
 370 375 380
 Arg Ser Cys Asp Met Gly Leu Gly Ile Pro Phe Asn Ile Ala Ser Tyr
 385 390 395 400
 Ala Leu Leu Thr His Met Ile Ala Gln Val Thr Asn Met Gln Val Gly
 405 410 415
 Glu Phe Ile His Val Leu Gly Asp Ala His Val Tyr Ser Asn His Val
 420 425 430
 Asp Gln Leu Lys Ile Gln Leu Glu Arg Ala Pro Tyr Pro Phe Pro Leu
 435 440 445
 Leu Lys Ile Asn Asn Asn Lys Gln Tyr Asn Ser Ile Glu Asp Phe Thr
 450 455 460
 Leu Glu Asp Phe Glu Leu Ile Gly Tyr Asn Tyr His Pro Lys Ile Gln
 465 470 475 480
 Met Lys Met Ala Val
 485

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una célula ciliada con actividad de de dihidrofolato reductasa (DHFR) reducida o esencialmente sin actividad de o con actividad de de timidilato sintasa (TS) reducida o esencialmente sin actividad de o con ambas actividades de dihidrofolato reductasa y de timidilato sintasa (DHFR-TS) reducidas o esencialmente sin actividad, que comprende las etapas de:
- 5 a) transformación de células ciliadas insertando una construcción que contiene un alelo que altera el gen que codifica la DHFR-TS endógena en al menos uno de los genes DHFR-TS endógenos del macronúcleo del ciliado (MAC).
- 10 b) inducción de un proceso de mezclado alélico en las células ciliadas transformadas para generar células que tienen la construcción insertada en la mayoría de todos los genes DHFR-TS funcionales del MAC, e
- c) identificación de las células generadas en la etapa b) por cultivo comparativo con o sin timidina,
- 15 y el gen DHFR-TS tiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con Sec. ID N° 1.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa a) la construcción que contiene un alelo que altera el gen que codifica la DHFR-TS endógena se inserta en al menos uno de los genes DHFR-TS endógenos del micronúcleo del ciliado (MIC), y en la etapa b) las células que tienen la construcción insertada en la mayoría de todos los genes DHFR-TS funcionales del MAC se generan por cruce de las células de la etapa a) con otras células ciliadas para producir una descendencia que contiene un nuevo MAC derivado del MIC alterado.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y/o 2, en el que el ciliado es *Tetrahymena*, en particular *Tetrahymena thermophila*.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3, en el que además se ha alterado la región de 1,5 kb secuencia arriba y abajo del gen endógeno de la célula que codifica la enzima bifuncional DHFR-TS.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-4 que comprende una etapa adicional de reconstitución de la actividad de la DHFR-TS por transfección de las células con una molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS endógena funcional así como otra proteína o enzima DHFR-TS no endógena funcional.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS funcional se deriva de un alveolado.
7. El procedimiento de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 5 y/o 6, en el que la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS funcional se deriva de un ciliado.
- 40 8. El procedimiento de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 5 - 7, en el que la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS se deriva de *Tetrahymena*.
9. El procedimiento de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 5 - 6, en el que la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS funcional se deriva de un apicomplejo.
- 45 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN o ARN que codifica una enzima DHFR-TS funcional es la Sec. ID N° 1.
- 50 11. Una célula ciliada con una auxotrofia por la timidina, obtenible por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.
12. La célula ciliada de acuerdo con la reivindicación 11 con actividad de DHFR reducida o esencialmente sin actividad o actividad de TS reducida o esencialmente sin actividad o ambas actividades de DHFR-TS reducidas o esencialmente sin actividad, en particular obtenible por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.
- 55 13. Una célula ciliada con actividad de DHFR-TS reconstituida, obtenible por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5.
- 60 14. El uso de células ciliadas de acuerdo con la reivindicación 13 en un ensayo para detectar compuestos químicos que afectan a la actividad de la enzima DHFR-TS, que comprende las etapas de:
- a) poner en contacto las células con el compuesto a ensayar,
- b) medir la actividad de la enzima DHFR-TS de las células, y
- 65 c) comparar la actividad de la enzima DHFR-TS con la actividad de la enzima DHFR-TS de las células de control.

15. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína DHFR-TS que tiene la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Sec. ID N° 1.

Figura 1: Estructura genómica de la enzima bifuncional DHFR-TS de *T. thermophila*

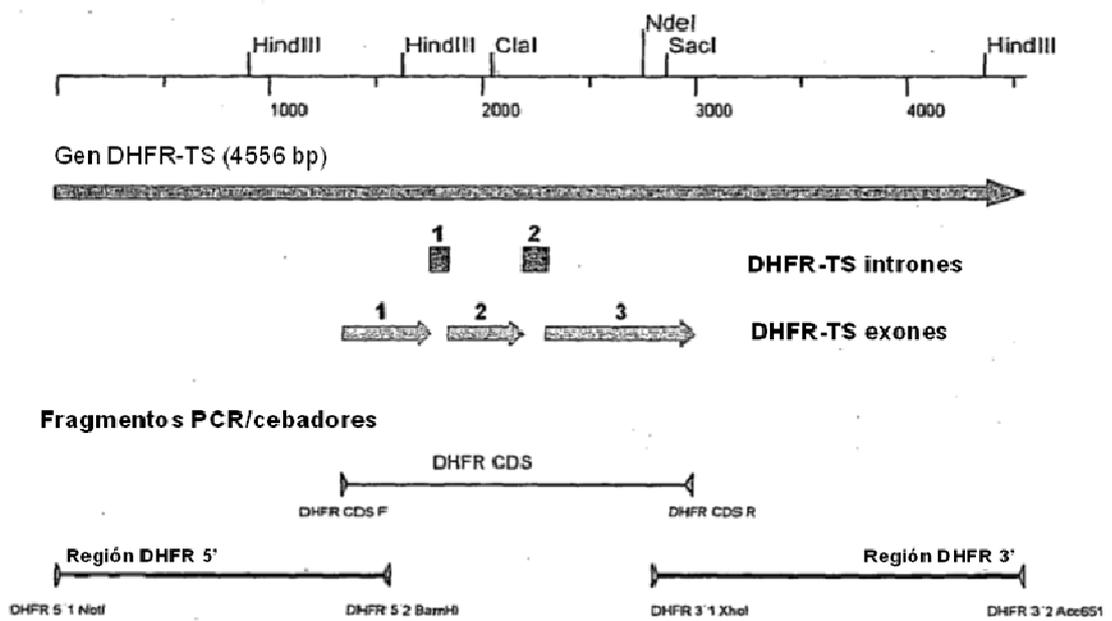


Figura 2: pKOI: Construcción de inactivación de GHFR-TS

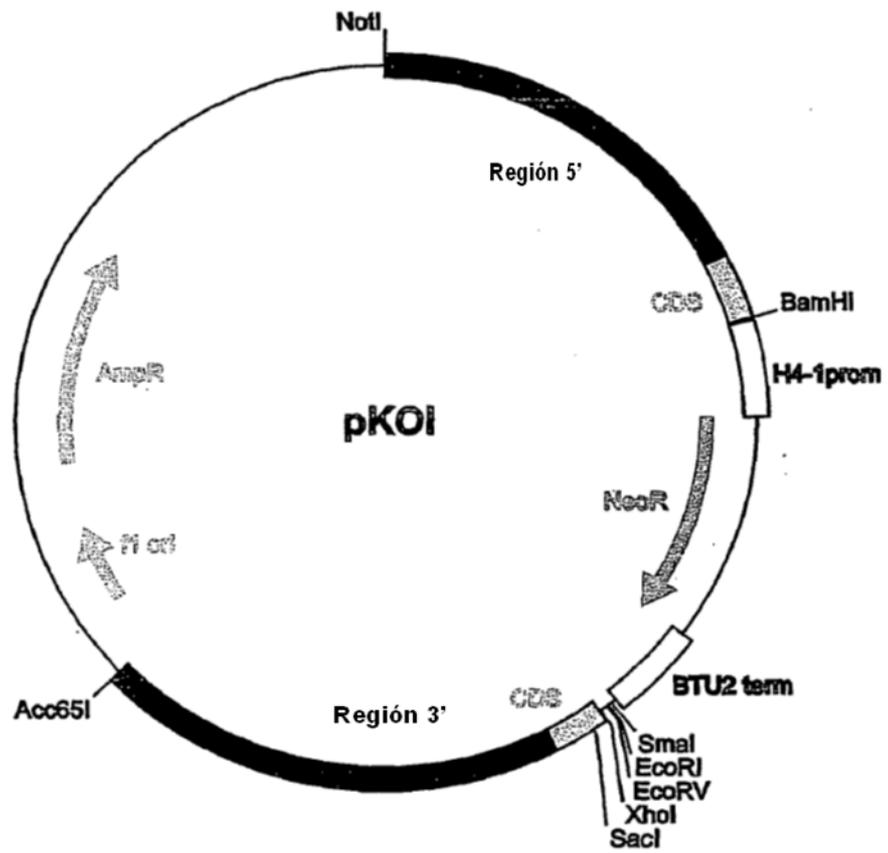


Figura 3: Generación de cepas DHFR-TS deficientes por mezclado alélico

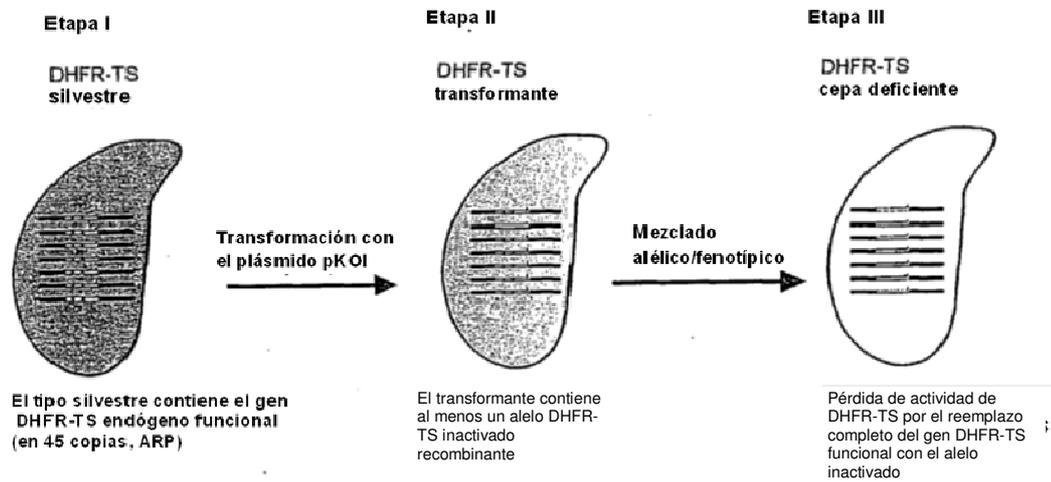


Figura 4: Selección de células DHFR-TS inactivadas por crecimiento en timidina

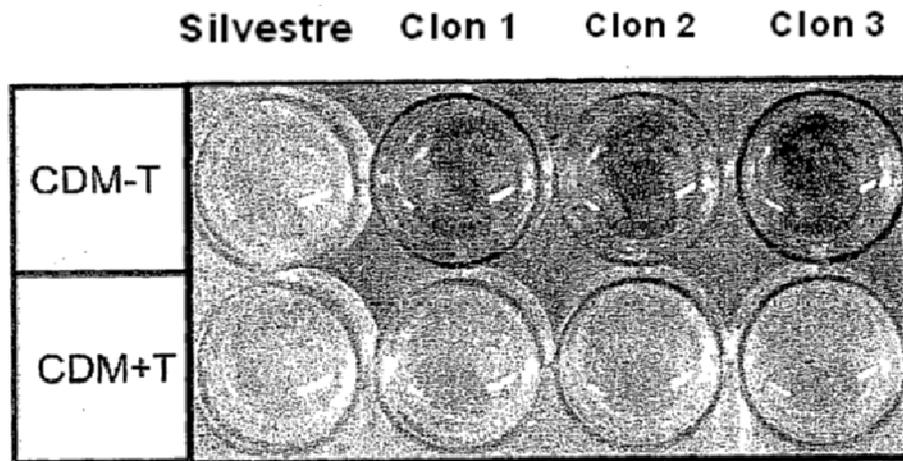


Figura 5: Crecimiento de *Tetrahymena* DHFR-TS deficiente comparado con el tipo silvestre

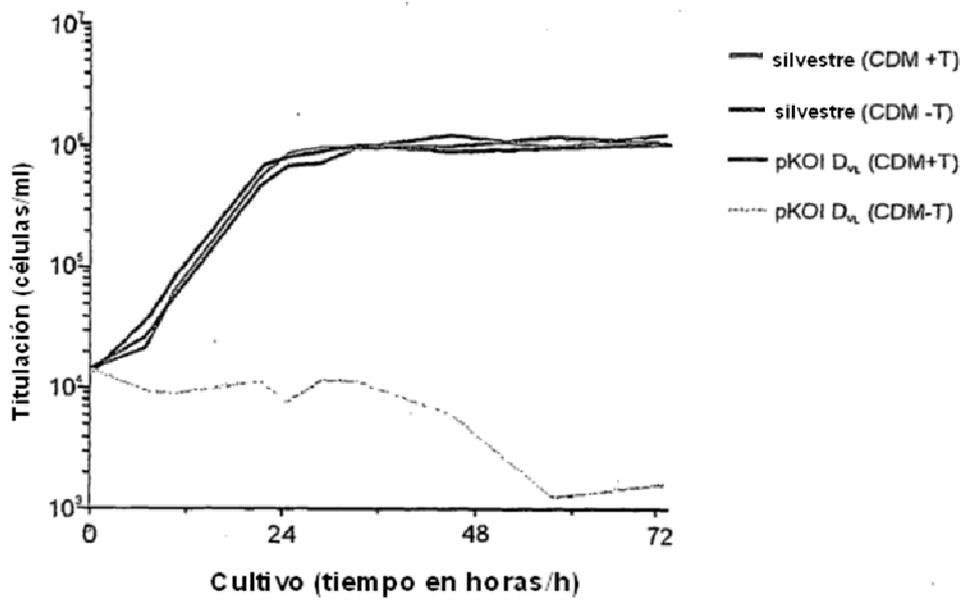
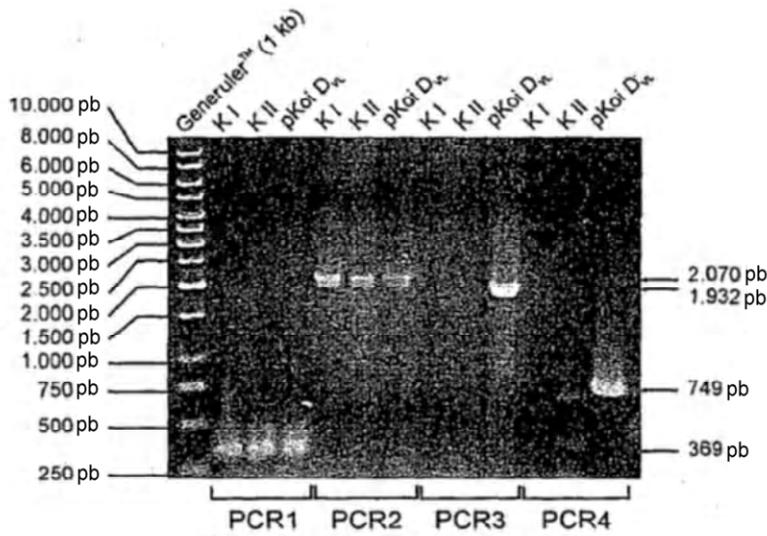
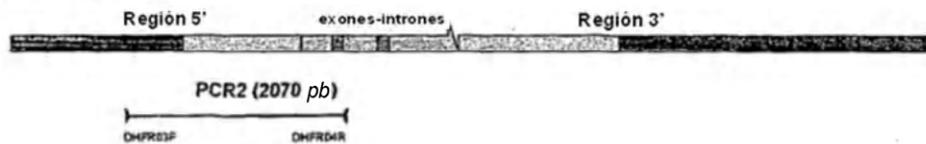


Figura 6: Integración apropiada de la construcción inactivada de DHFR-TS



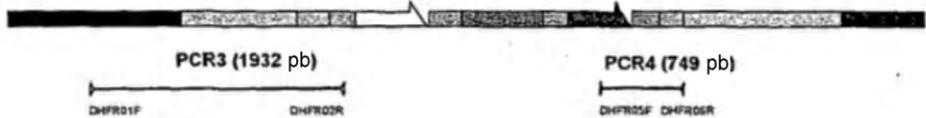
Estructura del gen DHFR-TS



Plásmido pKOI D_{VL}



Desactivación de DHFR-TS por activación (integración)



- | | |
|---|---|
| regiones secuencia arriba y abajo del gen DHFR-TS | gen de resistencia neo |
| regiones amplificadas por integración | terminador BTU2 |
| exón del gen DHFR-TS | estructura génica MTT-1 |
| intrón del gen DHFR-TS | precursor de la secuencia de PLA ₁ |
| promotor histona | secuencia que codifica la DNasa I humana |

Figura 7: Función enzimática de desactivación en la diana

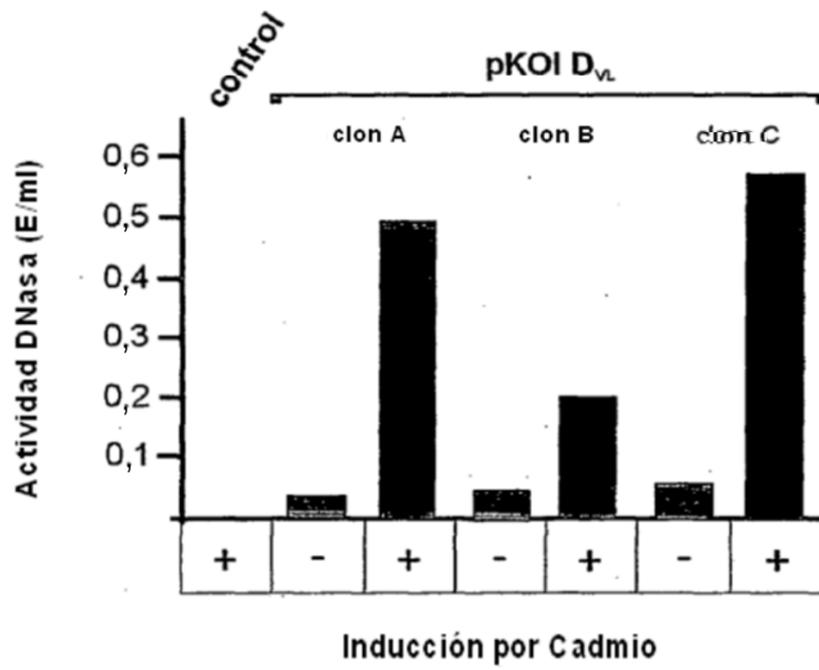


Figura 8: Expresión de la diana activada

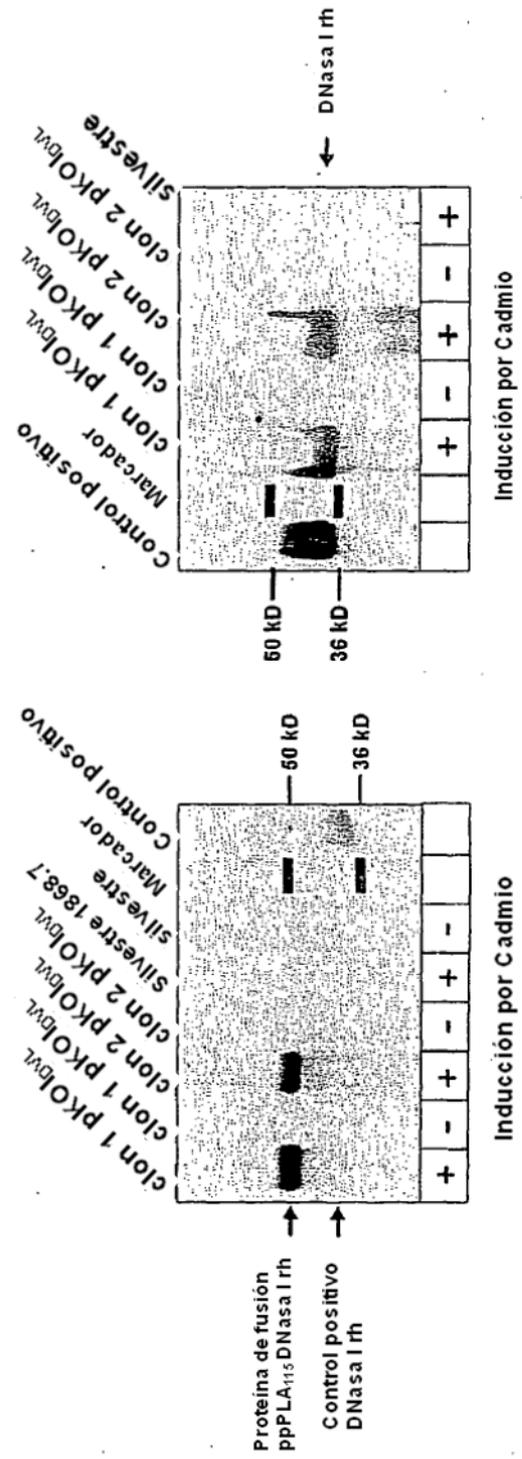


Figura 9: Resumen de la reconstitución de la actividad de DHFR-TS mediante activación

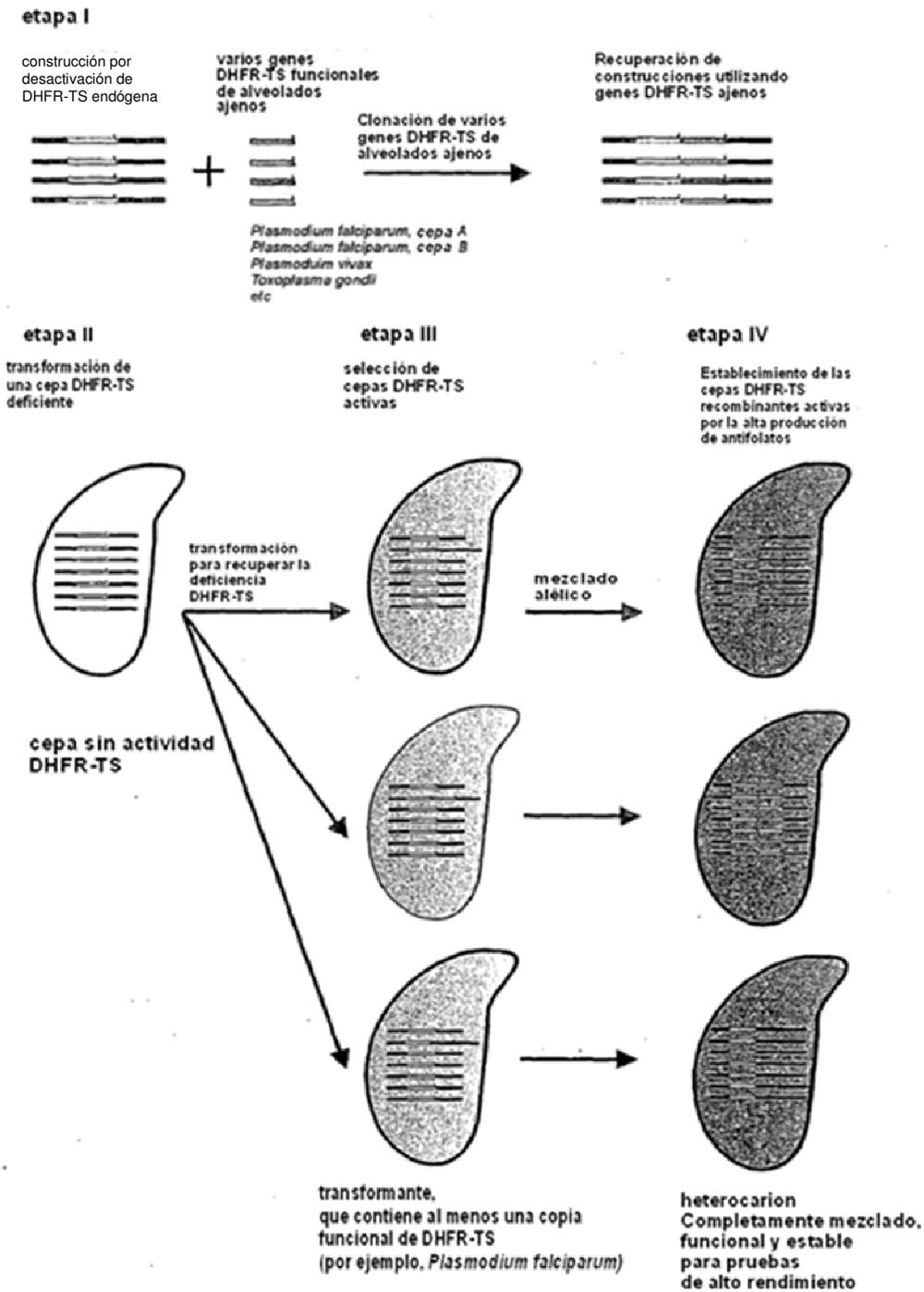


Figura 10:

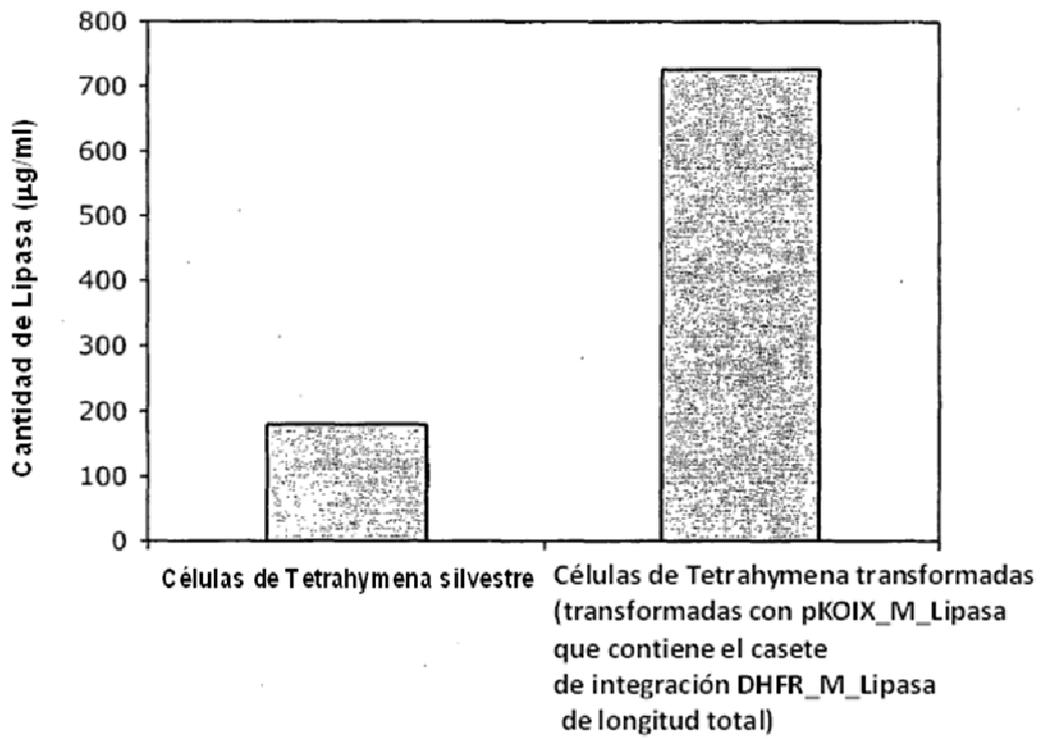


Figura 11

