

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 834**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014 PCT/EP2014/069261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014 E 14761658 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3044312**

54 Título: **Reactivos y métodos para la expresión de proteínas sensibles a oxígeno**

30 Prioridad:

11.09.2013 EP 13382352

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)**

**Ramiro de Maeztu 7
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**RUBIO HERRERO, LUIS MANUEL;
LÓPEZ TORREJÓN, GEMA;
JIMÉNEZ VICENTE, EMILIO y
BUESA GALIANO, JOSE MARÍA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 663 834 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

Reactivos y métodos para la expresión de proteínas sensibles a oxígeno

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la genética y, más particularmente a métodos para expresar una proteína sensible a oxígeno en una célula eucariota y para la reconstitución *in vitro* del complejo nitrogenasa activo.

10 **Antecedentes de la invención**

El nitrógeno es esencial en el desarrollo vegetal y un factor limitante en el crecimiento vegetal. Representa aproximadamente el 2% de la materia seca vegetal total que entra en las cadenas alimenticias. Sin embargo, las plantas no pueden acceder directamente al gas nitrógeno (N₂) que representa hasta el 78% de la atmósfera. Para que el gas nitrógeno se use para el crecimiento primero se debe fijar (es decir, reducir por hidrógeno a amoníaco) y estar disponible en la forma combinada de amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻). Las plantas adsorben dichas formas combinadas de nitrógeno a través de sus raíces.

Se sabe que el nitrógeno es el factor limitante principal del cultivo de plantas agrícolas ya que el suministro de nitrógeno por la fertilización es aunque eficiente sin embargo caro y está acompañado por una extrema contaminación medioambiental debido al uso ineficaz del nitrógeno por las plantas. Además, la fabricación de fertilizantes de nitrógeno requiere seis veces más energía de la necesaria para producir fertilizantes de fosforo o potasio. La concepción mundial en propagación del cultivo, la concepción de desarrollo sostenible da preferencia a la producción basada en recursos internos en lugar de usar externos.

Las denominadas bacterias aerobias fijadoras del nitrógeno, los miembros de los géneros *Azomonas*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Derxia* que pertenecen a la familia de Azotobacteraceae (Bergey's Manual of determinative Bacterology, 8ª ed., 1974), son capaces de una fijación eficaz del nitrógeno incluso a niveles de oxígeno atmosférico por la acción de un complejo enzimático evolutivamente conservado llamado nitrogenasa. Este complejo está compuesto de dos enzimas: una dinitrogenasa y una dinitrogenasa reductasa (Bulen *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1966 56: 979-986). Sin embargo, son incapaces en la naturaleza de incorporarse en los espacios tisulares internos de las plantas (Azotobacteraceae: The taxonomy and Ecologist of the Aerobic Nitrogen Fixing Bacteria, Academic Press, Nueva York, 1979) y de propagarse en los espacios intercelulares aunque se pudo probar que, cuando se asientan en las raíces o en las superficies externas de las hojas, estas especies pueden proporcionar la demanda de nitrógeno de algunas plantas a un nivel significativo o total (*J. Gen. Microbiol.* 71, 103-116, 1972; *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 261-271, 1979; *Can. J. Bot.* 69, 2296-2298, 1991). Ambos componentes proteicos de la nitrogenasa son extremadamente sensibles a oxígeno y las bacterias fijadoras de nitrógeno de forma aerobia han desarrollado una variedad de estrategias para proteger la nitrogenasa del envenenamiento por oxígeno. Entre los miembros del género *Azotobacter*, hay tres mecanismos para la protección de la nitrogenasa. Estos son la protección conformacional, regulación respiratoria y permeabilidad a oxígeno (Kennedy y Toukdarian, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1987).

Los denominados diazótrofos microaerófilos, que fijan el nitrógeno a bajos niveles de oxígeno, solo pueden formar endosimbiosis intercelulares (Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants, Sci. Tech. Publishers/Springer-Verlag, Madison, WI, pp. 84-88, 1987) que, sin embargo, pueden fijar gas nitrógeno solo en las raíces, es decir, lejos del sitio de la fotosíntesis. El ejemplo mejor conocido de asociación beneficiosa planta-bacteria para la nutrición de nitrógeno se produce en plantas con nódulos (Sprent y James, *Plant Physiology*, 2007, 144:575-581).

Berman *et al.*, 1985 *J. of Biol. Chem.*, 260(9): 5240-5243 describe que *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, transformadas con el gen *nifH* de *K. pneumoniae* en vectores de expresión adecuados, sintetizan el polipéptido sensible a oxígeno NifH.

Las plantas sin nódulos y bacterias fijadoras de nitrógeno pueden establecer asociaciones funcionales. *Azoarcus sp.* BH72 fija nitrógeno en condiciones microaerobias. A concentraciones nanomolares de oxígeno, estas células bacterianas pueden cambiar a un estado de mayor actividad de fijación de nitrógeno y eficacia respiratoria en el que se forman pilas de membranas intracitoplásmicas (diazosomas) relacionados con la fijación de nitrógeno, y la proteína con hierro de la nitrogenasa está muy enriquecida (Hurek *et al.*, *J. of Bacteriology*, 1994, 176: 1913-1923; Hurek *et al.*, *J. of Bacteriology*, 1994, 176:4726-4733;). La fusión transcripcional del promotor del gen de la nitrogenasa *nifH* a la proteína fluorescente verde describió altos niveles de expresión del gen de la nitrogenasa en *Azoarcus sp.* BH72 en raíces de arroz (Egener *et al.*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 1998, 11:71-75). Además, se desarrollaron métodos ecológicos moleculares para evaluar la expresión del ARNm de *nifH* en plantas de pasto kallar (*Leptochloa fusca*, *Poaceae*) inoculadas con esta bacteria. El cribado para el gen *nifH* mediante transcripción inversa específica de *nifH*-PCR en ARNm de raíz, mostró que *Azoarcus sp.* BH72 expresa genes de nitrogenasa dentro del sistema de raíz de la planta (Hurek *et al.*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 2002, 15:233-242).

65

La transformación genética de plantas con genes de interés es una técnica común usada para hacer plantas resistentes a plagas y a agentes que producen daño a los cultivos, para producir ciertos nutrientes o agentes farmacéuticos tales como vacunas y para mejorar el crecimiento de estas plantas para ayudar en la eficacia agrícola. Sin embargo, una planta genéticamente modificada capaz de fijar nitrógeno no se ha producido aún. Dos barreras principales han dificultado este planteamiento: la conocida sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno, que es el subproducto de la fotosíntesis de las plantas y la complejidad genética y bioquímica de la biosíntesis de la nitrogenasa.

La solicitud de patente US 3704546 proporciona un procedimiento aséptico para la fijación simbiótica del nitrógeno gaseoso en el que la primera etapa es el crecimiento aséptico de células vegetales sin diferenciar derivadas de miembros de las Leguminosae en un medio adecuado. Este método se basa en poner en contacto células vegetales sin diferenciar contenidas en un medio líquido que tiene los materiales nutrientes necesarios presentes y bacterias del género *Rhizobium*. Las células vegetales y las bacterias en el medio de cultivo líquido se incuban después juntas durante un tiempo adecuado y a una temperatura adecuada para permitir que los microorganismos entren y ocupen las células vegetales. El crecimiento y desarrollo adicional de las células vegetales con sus microorganismos contenidos se alcanza en un medio que sustancialmente no tiene actividad estimuladora de crecimiento sobre las células vegetales. La mayor actividad de fijación de nitrógeno se produce en esta última fase.

Se han llevado a cabo dos estudios para cocultivar especies de *Azotobacter* con células vegetales en condiciones *in vitro*. En el primer experimento (Carlson *et al.*, *Nature* 252, 393-395; 1974) se cultivó una cepa mutante auxotrófica para adenina de *Azotobacter vinelandii* con células de zanahoria en un medio que contenía sacarosa, que no tenía nitrógeno o contenía nitrógeno en una cantidad insuficiente para el crecimiento vegetal. Los cultivos de callos mezclados así obtenidos se mantuvieron creciendo durante 18 meses, mostraron actividad fijadora de nitrógeno y las bacterias se pudieron observar entre las células vegetales vivas. Sin embargo, este método tiene varios inconvenientes: se usa una cepa mutante auxotrófica de la especie *Azotobacter* que es difícil de aislar debido a su alto número de "cromosomas" (Sadoff *et al.*, *J. Bacteriol.*, 138, 871-877, 1979); el crecimiento de los cultivos es lento; el sistema es inestable en presencia de nitrógeno; no se pudieron regenerar plantas; la aplicabilidad del método se limita a unas pocas especies intensamente estudiadas debido al bajo número de cepas auxotróficas.

En el otro experimento (Vasil *et al.*, *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 95, 141-147, 1979) las bacterias engulleron el tejido vegetal y lo destruyeron. Por tanto, se hizo imposible cultivar durante un largo periodo y desarrollar una planta fijadora de nitrógeno.

Por tanto, sería ventajoso proporcionar un método que permita a las plantas fijar su propio nitrógeno evitando interacciones de plantas con bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas o asociativas específicas.

Breve compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína sensible a oxígeno y un péptido de direccionamiento mitocondrial, en donde dicha proteína sensible a oxígeno es NifH.

En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención operativamente unida a elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula eucariota que comprende el polinucleótido de la invención o el vector de expresión de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para expresar NifH en una célula eucariota que comprende las etapas de:

- i) introducir en dicha célula un polinucleótido según la invención o un vector que comprende dicho polinucleótido,
- ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína sensible a oxígeno y, si se desea
- iii) purificar dicha proteína sensible a oxígeno en condiciones anaerobias.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la reconstitución *in vitro* del complejo proteico nitrogenasa activo que comprende las etapas de:

- i) introducir en dicha célula un polinucleótido según la invención o un vector según la invención en donde la proteína sensible a oxígeno es NifH y en donde la célula comprende además una secuencia de

nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial,

- ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permiten la expresión de las proteínas NifH y NifM,
- iii) purificar la proteína NifH de dichas células en condiciones anaerobias y
- iv) poner en contacto dicha NifH de la etapa (iii) con el complejo NifDK.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido de la invención, un vector de expresión de la invención o una célula eucariota de la invención para su uso para expresar una proteína sensible a oxígeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende:

- i) un polinucleótido de la invención o un vector de expresión de la invención; y
- ii) reactivos para llevar a cabo el método para expresar una proteína sensible a oxígeno en una célula eucariota y/o el método para la reconstitución *in vitro* del complejo proteico de nitrogenasa activo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cuantificación de fluorescencia de las proteínas de fusión NifH-yEGFP y NifM-mKO expresadas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 2. Determinación de la actividad aconitasa en extractos sin células de las proteínas NifH y NifM inducidas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 3. Actividad nitrogenasa *in vitro* estimada mediante el ensayo de reducción de acetilo. (A) NifH purificada de levadura recombinante (muestra concentrada) (B) NifH purificada de levadura recombinante (muestra diluida), (1 a 4) titulación de la actividad NifDK con NifH. A: γ NifH 0,8 mg/ml; B: γ NifH 0,08 mg/ml; 1: 0 mg/ml (en ausencia de NifH); 2: 16 mg/ml (relación NifH/NifDK de 1:16); 3: 40 mg/ml (relación NifH/NifDK de 1:41); 4: 80 mg/ml (relación NifH/NifDK de 1:82). Ambos componentes se purificaron de *Azotobacter vinelandii*.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema de expresión de proteína eficaz que permite la expresión de proteínas sensibles a oxígeno en células eucariotas en condiciones aerobias. Este sistema de expresión se basa en la expresión de la proteína sensible a oxígeno en la mitocondria de la levadura. Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, es posible expresar proteínas sensibles a oxígeno en la mitocondria y recuperar la proteína en una forma activa. Por tanto, como se muestra en los ejemplos de la presente invención, el componente NifH de la nitrogenasa se ha purificado de mitocondrias de células de levadura que expresan una construcción que dirige NifH a la mitocondria. NifH se encuentra en forma activa, ya que es capaz de catalizar la formación de NH₃ en presencia del segundo miembro del complejo nitrogenasa (el complejo NifDK)

Polinucleótido de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína sensible a oxígeno y un péptido de direccionamiento mitocondrial, en donde dicha proteína sensible a oxígeno es NifH.

El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo ribonucleótidos, así como desoxirribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados por metilación, así como formas sin modificar. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma indiscriminada en la presente invención e incluyen ARNm, ADNc y polinucleótidos recombinantes. Como se usa en la presente invención, los polinucleótidos no están limitados a polinucleótidos como aparecen en la naturaleza, y también incluyen polinucleótidos en donde aparecen análogos de nucleótidos y enlaces internucleotídicos no naturales. Los ejemplos no limitantes de este tipo de estructuras no naturales incluyen polinucleótidos en donde el azúcar es diferente de ribosa, polinucleótidos en donde aparecen enlaces fosfodiéster 3'-5' y 2'-5', polinucleótidos en donde aparecen enlaces invertidos (3'-3' y 5'-5') y estructuras ramificadas. Además, los polinucleótidos de la invención incluyen enlaces internucleotídicos no naturales tales como ácidos péptido nucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), enlaces alquilfosfonatos de C1-C4 del tipo metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster de C1-C6, fosforotioato y fosforditioato. En cualquier caso, los polinucleótidos de la invención mantienen la capacidad de hibridar con ácidos nucleicos diana de una manera similar a los polinucleótidos naturales.

El término "proteína de fusión" como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas generadas por tecnología génica que consisten en dos o más dominios funcionales derivados de diferentes proteínas. Una proteína de fusión se puede obtener por medios convencionales (por ejemplo, por medio de expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en una célula adecuada). La proteína de fusión de la invención comprende una proteína sensible a oxígeno y un péptido de direccionamiento mitocondrial.

El término “proteína sensible a oxígeno” como se usa en el presente documento, se refiere a las que se oxidan fácilmente y se vuelven inactivas cuando se exponen a condiciones óxicas. En una forma de realización preferida, la proteína sensible a oxígeno es una enzima anaerobia. Muchas de tales proteínas contienen complejos metálicos que son sensibles a la presencia de oxígeno. Sin limitación, tales proteínas incluyen proteínas requeridas para las nitrogenasas de molibdeno (por ejemplo, nifH, nifDK, nifQ, nifB, nifEN, nifU); nitrogenasas de vanadio (por ejemplo, vnfH, vnfDGK, vnfEN, nfuV), nitrogenasas de hierro (por ejemplo, anfH, anfDGK, nfuA), monóxido de carbono deshidrogenasa (por ejemplo, cooS, cooF,), hierro hidrogenasa (por ejemplo, hydA, hydE, hydG), níquel-hierro hidrogenasa (por ejemplo, hycE), enzimas de acetogénesis (por ejemplo, piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), acetil-ScoA sintasa), enzimas de radical SAM de origen bacteriano (por ejemplo, MiaB, Biotina sintasa, RimO), cloruro de vinilo reductasa; 1,2-dicloroeteno deshalogenasa reductora; tricloroetene deshalogenasa reductora; tetracloroetene deshalogenasa reductora; bencilsuccinato sintasa; etilbenceno deshidrogenasa; ribonucleósido trifosfato reductasa sensible a oxígeno, y similares.

También se divulgan proteínas sensibles a oxígeno de un organismo procariota, preferiblemente de bacterias. Dichas bacterias pueden pertenecer a las bacterias fijadoras de nitrógeno, incluyendo bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas y bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre pueden fijar niveles significativos de nitrógeno sin la interacción directa con otros organismos. Sin limitación dichas bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre incluyen miembros de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Cyanobacteria* (clasificados como organismos aerobios) y los miembros de los géneros *Clostridium*, *Desulfovibrio* y las llamadas bacterias púrpuras del azufre, bacterias púrpura no sulfurosas y bacterias verdes del azufre. Las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas son esos organismos procariotas que pueden formar asociaciones estrechas con varios miembros de las *Poaceae* (hierbas). Estas bacterias fijan cantidades apreciables de nitrógeno en la rizosfera de las plantas huésped. Los miembros del género *Azospirillum* son representativos de bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas son esos microorganismos que fijan nitrógeno simbióticamente al asociarse con una planta huésped. La planta proporciona azúcares de la fotosíntesis que son utilizados por el microorganismo fijador de nitrógeno para la energía que necesita para la fijación de nitrógeno. Los miembros del género *Rhizobia* con representativos de bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas.

También se divulga una proteína sensible a oxígeno de *Azotobacter vinelandii* (*A. vinelandii*). El término “es de” o “aislado de” significa que dicho polinucleótido o polipéptido codificado está sustancialmente separado o purificado de otro ácido nucleico o polipéptido codificado en la célula del organismo en el que el ácido nucleico o polipéptido codificado se produce de forma natural. Por tanto, el término aislado abarca ácidos nucleicos purificados por métodos de purificación estándar para ácidos nucleicos o polipéptidos codificados. El término también comprende ácidos nucleicos o polipéptidos codificados preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos químicamente sintetizados o el polipéptido codificado de los mismos.

La proteína sensible a oxígeno es NifH. El término “NifH o dinitrogenasa reductasa o proteína de hierro o componente II de la nitrogenasa” se refiere a un componente del sistema nitrogenasa que funciona en concierto con NifDK (también conocida como proteína de molibdeno-hierro, dinitrogenasa o componente I de la nitrogenasa) para realizar la reducción de nitrógeno. NifH (número de acceso P00459, publicación del 23 de enero, 2007) es un homodímero de 60 kDa del producto del gen *nifH*, con simetría binaria que contiene sitios para la unión de Mg^{2+} , ATP e hidrólisis en la interfaz del dímero en cada subunidad y un único grupo $[Fe_4-S_4]$ en la interfaz de ambas subunidades. El grupo $[Fe_4-S_4]$ de NifH está coordinado por dos residuos de cisteína de cada subunidad. La unión e hidrólisis de Mg^{2+} y ATP produce cambios en la conformación de NifH y está acoplada a la transferencia de electrones del grupo $[Fe_4-S_4]$ al componente NifDK.

El polinucleótido de la invención codifica una proteína de fusión como se ha mencionado anteriormente que, además de NifH, también comprende un péptido de direccionamiento mitocondrial. El término “péptido de direccionamiento mitocondrial o señal de direccionamiento mitocondrial (SDM) o señal de localización mitocondrial (SLM)” se refiere a un péptido de 10-60 aminoácidos de longitud que dirige una proteína diana a la mitocondria. Consiste en un patrón alternante de aminoácidos hidrofóbicos y cargados positivamente para formar lo que se llama una hélice anfipática. La señal de direccionamiento mitocondrial puede contener señales adicionales que posteriormente dirigen la proteína a diferentes regiones de la mitocondria, tal como la matriz mitocondrial. En una forma de realización preferida, el péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal (extremo amino) respecto a la proteína NifH. Los péptidos de direccionamiento mitocondrial adecuados que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos que tienen la estructura general como se define por Heijne (EMBO J., 1986, 5: 1335-1342) o por Roise y Schatz (J.Biol.Chem., 1988, 263: 4509-4511). Los ejemplos no limitantes de péptidos de direccionamiento mitocondrial son los péptidos de direccionamiento mitocondrial definidos en la tabla I de von Heijne (anteriormente) así como los péptidos de direccionamiento mitocondrial de un polipéptido mitocondrial seleccionado del grupo que consiste en la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa humana, la isoforma P1 de la subunidad c de la ATP sintasa humana, secuencia de direccionamiento de aldehído deshidrogenasa, glutarredoxina 5, piruvato deshidrogenasa, peptidil-prolil isomerasa, acetiltransferasa, isocitrato deshidrogenasa, citocromo oxidasa, y las subunidades de la parte FA de la ATP sintasa. En una forma de realización preferida, el péptido de

direccionamiento mitocondrial es el péptido de direccionamiento mitocondrial de la superóxido dismutasa (SOD) de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (SEQ ID NO: 1).

Puede ser útil en algunas formas de realización de esta invención usar copias múltiples en tándem de un péptido de direccionamiento mitocondrial elegido. La secuencia codificante de un péptido de direccionamiento duplicado o multiplicado se puede obtener mediante ingeniería genética a partir un péptido de direccionamiento mitocondrial existente. La cantidad de péptido mitocondrialmente dirigido se puede medir por fraccionamiento celular, seguido, por ejemplo, por análisis de inmunotransferencia cuantitativo. Por tanto, en la presente invención, péptido de direccionamiento mitocondrial abarca una o más copias de un péptido aminoacídico que dirige una proteína diana a la mitocondria. En una forma de realización preferida, el péptido de direccionamiento mitocondrial comprende dos copias de un péptido de direccionamiento mitocondrial elegido. En otra forma de realización, el péptido de direccionamiento mitocondrial comprende tres copias de un péptido de direccionamiento mitocondrial elegido. En otra forma de realización, el péptido de direccionamiento mitocondrial comprende cuatro o más copias de un péptido de direccionamiento mitocondrial elegido.

En una forma de realización particular, el péptido de direccionamiento mitocondrial comprende dos copias en tándem del péptido de direccionamiento mitocondrial de la superóxido dismutasa (SOD) de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (SEQ ID NO: 2).

En una forma de realización particular, el polinucleótido de la invención codifica una proteína de fusión que comprende además al menos una etiqueta peptídica adecuada para la detección o purificación de la proteína de fusión, unida al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína de fusión. En una forma de realización preferida, dicha etiqueta está N-terminal respecto a la proteína NifH. Dicha etiqueta generalmente es un péptido o secuencia de aminoácidos que se puede usar en el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión. Por tanto, dicha etiqueta es capaz de unirse a uno o más ligandos, por ejemplo, uno o más ligandos de una matriz de afinidad tal como un soporte o bola de cromatografía con alta afinidad. El experto en la materia entenderá que la etiqueta está localizada en la proteína de fusión en un lugar que no produce la eliminación de la etiqueta de la proteína NifH una vez que la señal de direccionamiento mitocondrial se corta después de la importación en la mitocondria. Además, la etiqueta tiene que estar localizada de modo que no interfiera con la maquinaria de importación mitocondrial. Por tanto, en una forma de realización preferida, el polinucleótido de la invención codifica una proteína de fusión que comprende, en orden de N- a C-terminal, un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal, la etiqueta de detección/purificación y la proteína NifH. En otra forma de realización, el polinucleótido de la invención codifica una proteína de fusión que comprende, en orden de N- a C-terminal, un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal, la proteína NifH y la etiqueta de detección/purificación.

Un ejemplo de dicha etiqueta es una etiqueta de histidina (etiqueta His o HT), tal como una etiqueta que comprende varios residuos de histidina (por ejemplo, 6 residuos [His6 o H6]; 8 residuos [His8 o H8]), que se puede unir a una columna de níquel (Ni^{2+}) o cobalto (Co^{2+}) con alta afinidad. La etiqueta His tiene la característica deseable de que se puede unir a su ligando en condiciones que son desnaturizantes para la mayoría de las proteínas y disruptivas de la mayoría de las interacciones proteína-proteína. Por tanto, se puede usar para eliminar la proteína cebo etiquetada con H6 después de la disrupción de las interacciones-proteína en las que ha participado el cebo.

Ejemplos adicionales ilustrativos, no limitantes, de etiquetas útiles para detectar, aislar o purificar una proteína de fusión incluyen etiquetas fluorescentes tales como fluoresceína, resorufina y derivados de las mismas, etiqueta Arg, etiqueta FLAG, etiqueta Strep, un epítipo que puede ser reconocido por un anticuerpo, tal como la etiqueta c-myc (reconocido por un anticuerpo anti-c-myc), la etiqueta SBP, etiqueta S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, etiqueta glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, etiqueta Avi, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como Ala-His-Gly-His-Arg-Pro (SEQ ID NO: 3); Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser (SEQ ID NO: 4); Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (SEQ ID NO: 5); β -galactosidasa y similares.

En otra forma de realización, la proteína de fusión que comprende la proteína sensible a oxígeno NifH, y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente el péptido de direccionamiento mitocondrial de SOD también comprende una proteína fluorescente. Mediante "proteína fluorescente" se quiere decir cualquier proteína capaz de emitir luz cuando se excita con la radiación electromagnética/luz apropiada (es decir, luz de una longitud de onda apropiada). La proteína fluorescente absorberá energía de una longitud de onda específica y reemitirá energía a una longitud de onda diferente (pero igualmente específica). La proteína fluorescente puede estar en el extremo N o C respecto a la proteína sensible a oxígeno. Las proteínas fluorescentes que se pueden usar incluyen fluoróforos biológicos y químicos. Los fluoróforos biológicos ejemplares comprende T-sapphire, Cerulean, mCFPm, CyPet, EGFP, PA-EGFP, Emerald, EYFP, Venus, mCitrine, mKO1 (naranja Kusabira monomérico 1) mOrange, DSRed, JRed, mStrawberry, mCherry, PA-mCherry, mRuby, Tomato, mPlum, mKate, mKatushka, Kaede, Halotag, y flúor supereclíptico. Los fluoróforos químicos ejemplares comprenden Alexafluor, rodamina, BODIPY, tetrametilrodamina, colorantes de cianina, fluoresceína, puntos cuánticos, colorantes IR, colorantes FM, colorantes ATTO. En otra forma de realización, la etiqueta de detección es un motivo tetracisteína. Como se usa en el presente documento, "motivo tetracisteína" se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que contiene cuatro cisteínas (CCXXCC) (SEQ ID NO: 6) codificada en el extremo N o C de la proteína NifH que se une a colorantes biarsénicos, ReAsH (fluorescente

rojo) y FIAsh (fluorescente verde), con alta especificidad incluso en células vivas. FIAsh es un derivado de fluoresceína, modificado para contener dos átomos de arsénico a una distancia fija entre sí. ReAsH se basa en resorufina y se ha modificado similarmente.

5 En una forma de realización preferida, el polinucleótido según la invención comprende SEQ ID NO:7.

El experto en la materia entenderá que puede ser deseable que la proteína de fusión comprenda además un péptido flexible que una la proteína sensible a oxígeno NifH, y la etiqueta de purificación/detección.

10 Como se usa en el presente documento, el término “péptido flexible”, “péptido espaciador” o “péptido enlazador” se refiere a un péptido que une covalentemente la proteína NifH y el péptido de direccionamiento mitocondrial, que no es parte ni de la proteína NifH ni del péptido de direccionamiento mitocondrial, lo que permite el movimiento de uno con respecto al otro, sin producir efecto dañino sustancial en ninguna de la proteína o la fracción. En una forma de realización preferida, dicho péptido flexible se une a la proteína NifH y al péptido de direccionamiento mitocondrial sustancialmente sin producir un efecto dañino en la función ni en la proteína NifH ni del péptido de direccionamiento mitocondrial. Si no es necesario que la proteína NifH y el péptido de direccionamiento mitocondrial estén dispuestos en ese orden y, en este caso, la invención contempla proteínas de fusión en las que la proteína NifH está situada en posición amino-terminal respecto al péptido de direccionamiento mitocondrial, y en donde la proteína NifH está situada en posición carboxi-terminal respecto al péptido de penetración celular.

20 El péptido flexible comprende al menos un aminoácido, al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cuatro aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos seis aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 45 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos. En algunas formas de realización, el péptido flexible permitirá el movimiento de una proteína con respecto a la otra para aumentar la solubilidad de la proteína y/o mejorar su actividad CPP. Si se desea, el péptido flexible puede abarcar repeticiones de poliglicina o combinaciones de residuos de glicina, prolina y alanina.

En una forma de realización preferida, las secuencias que codifican la proteína de fusión del polinucleótido de la invención tienen codones optimizados para la expresión en una célula eucariota.

35 El término “codones optimizados”, como se usa en el presente documento, se refiere a la alteración de codones en moléculas de ácidos nucleicos para reflejar el uso de codones típico del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ADN, para mejorar la expresión. Hay varios métodos y herramientas de software conocidas en la técnica para la optimización de codones. Véase, Narum D, *et al.*, *Infect. Immun.* 2001; 69(12):7250-7253, Outchkourov N, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2002; 24(1):18-24, Feng L, *et al.*, *Biochemistry* 2000; 39(50):15399-15409, y Humphreys D, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2000; 20(2):252-264.

En una forma de realización aún más preferida, dicha optimización de codones es para la expresión en levadura.

45 En una forma de realización aún más preferida, el polinucleótido de la invención comprende un nucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína sensible a oxígeno NifH y un péptido de direccionamiento mitocondrial como se ha descrito anteriormente, que están operativamente unidos a elementos reguladores de transcripción o traducción adecuados. Los elementos reguladores de transcripción o traducción pueden derivar de, por ejemplo, genes de mamífero, microbianos, víricos o de insecto. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genético(s) que tiene(n) un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe a ARNm y se traduce a proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de transcripción y traducción, como se describe en detalle posteriormente. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están operativamente unidas cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de modo que permita la traducción. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, de forma alternativa, secuencias potenciadoras y/o secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de nucleótidos, secuencias supresoras, sitios de inicio transcripcional, sitios de parada transcripcional, sitios de poliadenilación y similares. En la técnica se conocen un gran número de secuencias de control de la expresión y se pueden utilizar según la presente invención. En el caso de células eucariotas comprenden normalmente promotores que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito, por ejemplo, las del ARN de 35S del

virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Otros promotores comúnmente usados son el promotor del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor de poliubiquitina y el promotor de la actina para la expresión ubicua. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huéspedes eucariotas comprenden, por ejemplo, el promotor de SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous, potenciador de CMV, potenciador de SV40. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención también abarcan potenciadores traduccionales eucariotas tales como las secuencias omega de CAMV o la inclusión de intrones que puede aumentar el nivel de expresión hasta 100 veces (Maiti et al., 1997, Transgenic Research 6: 143-156). El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante del polinucleótido, entonces se usa un promotor constitutivo. Se usa un promotor "inducible" cuando se desea una expresión regulada del polinucleótido dependiendo de las condiciones fisiológicas o de desarrollo. Los promotores típicos para la expresión en células de levadura incluyen, pero no están limitados a:

- Promotores constitutivos tales como, por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1- α (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor de MRP7 y el promotor de la alcohol, oxidasa (AOX1).
- Promotores inducibles tales como, por ejemplo, el promotor de la metalotioneína (CUP1), cuya expresión está regulada por medio de la adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (al factor α) como se describe en el documento US5063154, el promotor TET, cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a alta temperatura.
- Promotores represibles tales como, por ejemplo, el promotor del gen de la enolasa (ENO-1) de *S. cerevisiae*, cuya expresión se puede reprimir cuando el microorganismo se cultiva en una fuente de carbono no fermentable, así como promotores cuya expresión está sometida a represión de glucosa de modo que la expresión se reprimirá cuando parte de la lactosa se haya hidrolizado y la concentración de glucosa en el medio empiece a aumentar, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *S. cerevisiae*, y el promotor de galactoquinasa (GAL1) de *S. cerevisiae*.

Diferentes promotores se usan preferiblemente en las dos construcciones de modo que la expresión de la α -galactosidasa y la proteína heteróloga se puedan regular independientemente. Preferiblemente, en esos casos en los que se sospecha que la proteína heteróloga es tóxica para la célula huésped, el promotor usado para regular su expresión es aconsejablemente un promotor inducible de modo que la expresión de la proteína de interés se pueda retrasar hasta que se hayan alcanzado suficientes niveles de biomasa.

En otra forma de realización, el polinucleótido de la invención que codifica la proteína NifH, preferiblemente de *A. vinelandii*, y un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal respecto a la proteína NifH, comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un segundo péptido de direccionamiento mitocondrial.

El término "NifM" como se usa en el presente documento se refiere al gen *nifM* y a la proteína NifM de *A. vinelandii*. La proteína NifM (número de acceso P14890, publicado el 1 de abril, 1990), es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa que se requiere para la maduración y activación de la proteína de Fe de la nitrogenasa (Rubio y Ludden, 2005, *J. of Bact.*, 187, 2: 405-414).

La proteína de fusión que comprende NifM también comprende un segundo péptido de direccionamiento mitocondrial. El término "péptido de direccionamiento mitocondrial" y ejemplos del mismo adecuados para su uso en esta invención se han definido anteriormente y aplican igualmente a esta forma de realización de la invención. Dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está preferiblemente situado N-terminal respecto a la proteína NifM. La segunda secuencia de direccionamiento mitocondrial puede ser igual o diferente que la primera secuencia de direccionamiento mitocondrial. En una forma de realización preferida, el segundo péptido de direccionamiento mitocondrial es el péptido de direccionamiento mitocondrial de la superóxido dismutasa (SOD) de *S. cerevisiae*.

El orden de las regiones en el polinucleótido de la invención no es particularmente limitante. Por tanto, en una forma de realización, la región que codifica la proteína de fusión que comprende NifH y la señal de direccionamiento mitocondrial está situada en 5' con respecto a la proteína de fusión que comprende NifM y la segunda señal de direccionamiento mitocondrial.

El experto en la materia entenderá que puede ser deseable que la proteína de fusión que comprende la proteína NifM, y un segundo péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente el péptido de direccionamiento mitocondrial de SOD comprenda además un péptido flexible que une NifM y el grupo fluorescente. El término "péptido flexible" se ha definido anteriormente y aplica igualmente para esta forma de realización de la invención. Si se desea, esa proteína de fusión que comprende la proteína NifH, el péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal respecto a dicha proteína NifH y el grupo fluorescente, comprende además un motivo tetracisteína. El

término “motivo tetracisteína” se ha descrito para la proteína de fusión que comprende NifH y aplica igualmente para esta forma de realización de la invención.

5 En una forma de realización particular, dicha proteína de fusión que comprende la proteína NifM, comprende al menos una etiqueta peptídica adecuada para la detección o purificación de la proteína de fusión unida a los dominios C-terminal o N-terminal de dicha proteína de fusión o variante de la misma. En una forma de realización preferida, dicha etiqueta está N-terminal respecto a la proteína NifM. Dicha etiqueta generalmente es un péptido o una secuencia de aminoácidos que se puede usar en el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión. Por tanto, dicha etiqueta puede unirse a uno o más ligandos, por ejemplo, uno o más ligando de una matriz de afinidad tal como un soporte o bola de cromatografía con alta afinidad. Un ejemplo de dicha etiqueta es una etiqueta flag (etiqueta Flag u octapéptido flag) que es reconocida por algunos anticuerpos comercialmente disponibles (por ejemplo, M1/E11, M2). La estructura de la etiqueta flag se ha optimizado para compatibilidad con las proteínas a las que está unida, en que es más hidrofílica que otras etiquetas epítopos comunes y por tanto es menos probable que desnaturalice o inactive proteínas a las que está añadida. Además, las etiquetas flag N-terminales se pueden eliminar fácilmente de las proteínas una vez que se han aislado, por tratamiento con la proteasa específica enteroquinas. Ejemplos adicionales ilustrativos, no limitantes, de etiquetas útiles para el aislamiento o la purificación se han descrito anteriormente y aplican igualmente a esta forma de realización de la invención.

20 En una forma de realización preferida, las secuencias que codifican la proteína de fusión que comprende NifM tienen codones optimizados para la expresión en células eucariotas. En una forma de realización aún más preferida, la optimización de codones es para expresión en levadura. El término “optimización de codones” así como los promotores típicos usados para la expresión en levadura se han explicado previamente y aplican igualmente a esta forma de realización de la invención.

25 En una forma de realización preferida, el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, preferiblemente de *A. vinelandii*, y un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal respecto a la proteína NifH, y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende NifM y un segundo péptido de direccionamiento mitocondrial en donde dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM comprende además elementos reguladores adecuados de transcripción y traducción. Ejemplos de elementos reguladores adecuados de transcripción y traducción se han descrito anteriormente y aplican igualmente a esta forma de realización de la invención.

35 En una forma de realización preferida, la región en el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, preferiblemente de *A. vinelandii*, y un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal y la región en el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende NifM y una segunda señal de direccionamiento mitocondrial están bajo el control de una única señal reguladora transcripcional, de modo que ambas proteínas de fusión están codificadas por un único ARNm. En este caso, el polinucleótido de la invención puede comprender además un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) 5' respecto a la región que codifica la proteína de fusión que está localizada después en el polinucleótido de la invención. En otra forma de realización, la región en el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, preferiblemente de *A. vinelandii*, y un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal y la región en el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende NifM y una segunda señal de direccionamiento mitocondrial comprenden regiones reguladoras transcripcionales independientes.

45 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polinucleótido según la invención para expresar una proteína NifH.

Vectores de expresión y células de la invención

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención.

El término “vector de expresión” se refiere a una construcción de ADN replicativa usada para expresar ADN que codifica el polipéptido de la invención y que incluye una unidad transcripcional que comprende el ensamblaje de (1) elemento(s) genético(s) que desempeña(n) un papel regulador en expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o potenciadores, operativamente unidos a (2) una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la invención y que se transcribe a ARN mensajero y se traduce a proteína y (3) secuencias adecuadas para iniciar y terminar la transcripción y la traducción. Preferiblemente, en este caso en el que es deseable la expresión de estos dos genes heterólogos, *nifH* y *nifM*, se puede usar un vector que comprende los promotores divergentes GAL1-GAL10 que permite la coexpresión de ambas proteínas.

65 Los vectores que se pueden usar en el contexto de la presente invención normalmente incluyen un marcador genético, un origen de replicación en bacterias o levaduras, sitios múltiples de clonación y un marcador genético. El marcador genético es habitualmente un gen que confiere resistencia a un antibiótico o alternativamente, un marcador auxotrófico en el caso de levaduras.

Los vectores de levaduras adecuados para la presente invención se pueden basar en los siguientes tipos de plásmidos:

- 5 - Plásmidos autónomos multicopia: estos plásmidos contienen secuencias que permiten generar múltiples copias de dichos vectores. Estas secuencias pueden ser la denominada 2μ tal como la que aparece en plásmidos episomales (YE_p o plásmidos episomales de levadura) o secuencias de tipo ARS tales como las que aparecen en plásmidos de replicación (YR_ps o plásmidos de replicación de levadura). Los ejemplos de vectores basados en plásmidos de este tipo son p426GPD, p416GPD, p426TEF, p423GPD, p425GPD, p424GPD o p426GAL, YE_p24 y YE_plac.
- 10 - Plásmidos autónomos de copia única: plásmidos que contienen la secuencia de replicación autónoma ARS1 y una secuencia centromérica (CEN4). Los plásmidos de este tipo incluyen los plásmidos centroméricos (YC_ps o plásmidos centroméricos de levadura).
- 15 - Plásmidos de integración: plásmidos que pueden ser integrados en el genoma de la célula huésped. Los plásmidos de este tipo incluyen plásmidos de integración (YIPs o plásmidos de integración de levadura). Los ejemplos de vectores basados en plásmidos de este tipo son pRS303, pRS304, pRS305 o pRS306 y similares.

20 Generalmente, todos los vectores mencionados por Sikorski ("Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*", en Plasmid, A Practical Approach, Ed. K. G. Hardy, IRL Press, 1993) y por Ausubel *et al.* ("Yeast Cloning Vectors and Genes" Current Protocols in Molecular Biology, Sección II, Unidad 13.4, 1994) son útiles en el contexto de la presente invención.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula eucariota que contiene el polinucleótido según la invención o el vector de expresión que contiene el polinucleótido según la invención.

30 En otra forma de realización preferida, dicha célula eucariota crece en condiciones aerobias. El término "condiciones aerobias" como se usa en el presente documento se refiere a un medio oxigenado. Las células eucariotas que crecen en condiciones aerobias incluyen: organismos anaerobios facultativos, que incluyen organismos que pueden usar oxígeno, pero también tienen métodos anaerobios de producción de energía; organismos aerobios obligados, que requieren oxígeno para la respiración celular aerobia en donde dichos organismos usan oxígeno para oxidar sustratos (es decir, azúcares y grasas) para obtener energía; organismos microaerófilos, que incluyen organismos que pueden usar oxígeno pero a bajas concentraciones; y organismos aerotolerantes, que son esos organismos que pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, pero son anaerobios porque no usan oxígeno como aceptor terminal de electrones.

35 En una forma de realización aún más preferida, dicha célula eucariota es una célula de levadura. Las células de levadura pertenecen a los organismos anaerobios facultativos y obtienen energía (ATP) mediante respiración aerobia si está presente el oxígeno, pero también pueden cambiar a fermentación. Levadura se entiende como cualquier organismo eucariota que pertenece al tipo de los ascomicetos que incluye organismos generalmente conocidos como levaduras, así como los generalmente conocidos como hongos filamentosos. Las levaduras y hongos filamentosos incluyen *Pichia* sp (por ejemplo, *P. pastoris*, *P. finlandica*, *P. trehalophila*, *P. koclamae*, *P. membranaefaciens*, *P. minuta*, *P. opuntiae*, *P. thermotolerans*, *P. salictaria*, *P. guercuum*, *P. pijperi*, *P. stiptis*, *P. methanolica*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickerhamii*, *K. waltii*, *K. drosophilum*, *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*, *K. yarrowia*), *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Penicillium*, *Totypocladium*, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*), *Hansenula polymorpha*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* sp. (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Candida albicans*, *Aspergillus* sp (por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillum niger*, *Aspergillus oryzae*), *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium luchiwense*, *Fusarium* sp. (por ejemplo, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*), *Physcomitrella patens*.

40 Virtualmente cualquier levadura se puede considerar en la presente invención; sin embargo, en una forma de realización particular, dicha levadura es levadura del género *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*.

55 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un vector de expresión según la invención o de una célula según la invención para expresar una proteína NifH.

Método para expresar NifH en una célula eucariota

60 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para expresar NifH en una célula eucariota que comprende las etapas de:

- i) introducir en dicha célula un polinucleótido según la invención o un vector que comprende dicho polinucleótido,
- 65 ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína sensible a oxígeno y, si se desea

- iii) purificar dicha proteína sensible a oxígeno en condiciones anaerobias.

Los términos “proteína sensible a oxígeno” y “célula eucariota” se han definido anteriormente y aplican igualmente a este aspecto de la invención.

5 En la primera etapa el método para expresar una proteína NifH en una célula eucariota (de aquí en adelante, primer método de la invención) comprende introducir en dicha célula eucariota el polinucleótido o el vector según la invención.

10 El término “introducir en la célula eucariota el polinucleótido de la invención o introducir en la célula eucariota el vector de la invención” se refiere a un proceso de administración de dicho ácido nucleico a una célula de levadura. Los métodos adecuados para introducir una molécula de ADN en una célula de levadura incluyen, pero no están limitados a:

- 15
- Transformación de esferoplastos que supone eliminar la pared celular de la levadura y poner en contacto los esferoplastos con el plásmido en presencia de PEG.
 - Transformación con Li^+ , que supone el tratamiento de las células de levadura con cationes alcalinos monovalentes (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ y Li^+) en combinación con PEG para estimular la absorción de ADN por las células intactas.

20

 - Bombardeo génico que supone bombardear las células con microproyectiles recubiertos con el ADN exógeno.
 - Electroporación, que supone administrar pulsos eléctricos a las levaduras que produce la apertura de poros en la membrana de los esferoplastos y células de levadura intactas.

25 Los transformantes se hacen crecer en un medio nutriente adecuado y, donde sea apropiado, se mantienen bajo presión selectiva para asegurar la retención del ADN endógeno. Cuando la expresión es inducible, se puede permitir el crecimiento de la levadura huésped para dar una alta densidad de células, y después se induce la expresión. La proteína no de levadura se puede recoger por cualquier medio convencional, y purificar por cromatografía, electroforesis, diálisis, extracción solvente-solvente, y similares.

30 La segunda etapa del primer método de la invención comprende hacer crecer dichas células transformadas en condiciones que permiten la expresión de la proteína NifH según la invención. Dichas condiciones adecuadas para la expresión de la proteína sensible a oxígeno según la invención incluyen condiciones que son las que permiten un crecimiento óptimo de la célula de levadura y las que permiten la expresión de la proteína en dichas células. Las condiciones para optimizar el cultivo de células de levadura y la expresión de dicha proteína heteróloga dependerán del promotor que regula la expresión del gen heterólogo.

35

En una forma de realización preferida, la célula transformada contiene un polinucleótido que codifica la proteína NifH y un péptido de direccionamiento mitocondrial, en donde dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a la proteína NifH y, preferiblemente es SOD de *S. cerevisiae*, operativamente unido a elementos reguladores adecuados de transcripción o traducción. En una forma de realización aún más preferida, la expresión del gen *nifH* está dirigida desde el promotor GAL1. Las condiciones óptimas para el crecimiento celular y la expresión de NifH bajo el promotor GAL1 son, por ejemplo, esas en donde los transformantes se hacen crecer en condiciones aerobias a saturación en medio selectivo mínimo que contiene altos niveles de glucosa, tal como glucosa al 2% a 30°C. Una vez la glucosa se consume se puede añadir galactosa al 2% al cultivo celular para inducir la expresión de la proteína NifH. Después de la inducción de la expresión de NifH, las células se pueden cultivar durante 24-72 horas que permiten la máxima producción de proteína.

40

45

En otra forma de realización preferida, la célula transformada de la invención contiene el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente SOD de *S. cerevisiae*, N-terminal respecto a la proteína NifH, comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente SOD de *S. cerevisiae*, N-terminal respecto a la proteína NifM, operativamente unido a elementos reguladores adecuados de transcripción o traducción. Preferiblemente, en este caso en que es deseable la expresión de estos dos genes heterólogos, *nifH* y *nifM*, se puede usar un vector de expresión que comprende los promotores divergentes GAL1-GAL10 que permite la coexpresión de ambas proteínas. Las condiciones óptimas para el crecimiento celular y la expresión de NifH y NifM son las condiciones explicadas anteriormente.

50

55

60 Considerando que la primera y la segunda etapa del primer método de la invención se pretenden para expresar y purificar la proteína NifH, es deseable probar si las condiciones anaerobias se han mantenido durante la inducción y purificación de dicha proteína. La proteína de fusión de la invención (o el polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión) se expresa en la mitocondria en donde se dan las condiciones anaerobias. Por tanto, cualquier ensayo que permita la determinación de la actividad mitocondrial sería útil para determinar la falta de condiciones de agresión de oxígeno durante la inducción de galactosa. Si se desea, se puede medir la actividad de la enzima aconitasa (véase, por ejemplo, Kennedy et al., 1983, J. Biol. Chem, 258: 11098-11105).

65

La expresión de la proteína de fusión durante la segunda etapa del primer método de la invención se puede seguir por métodos bien conocidos en la técnica tales como inmunotransferencia o inmunofluorescencia. Virtualmente, se puede usar cualquier método convencional en el marco de la invención para detectar, y si se desea, cuantificar la proteína NifH. A modo de ilustración no limitante, los niveles de expresión se pueden determinar por medio de anticuerpos con la capacidad de unirse específicamente a la proteína ensayada (o a fragmentos de la misma que contienen los determinantes antigénicos) y posterior cuantificación de los complejos antígeno-anticuerpo resultantes.

Hay una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar según la presente invención, tal como la aplicación combinada de anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), transferencia Western o inmunotransferencia, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA (inmunoensayo enzimático) competitivo, DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), inmunofluorescencia. Otras formas de detectar y cuantificar proteína incluyen, por ejemplo, técnicas de cromatografía de afinidad o ensayos de unión a ligando. Puesto que la señal de direccionamiento mitocondrial se corta tras la entrada de la proteína de fusión en la mitocondria, también es posible seguir la acumulación de la proteína en la mitocondria detectando la acumulación de la proteína de fusión procesada usando cualquier técnica que permita detectar el cambio en peso molecular que se produce después de la eliminación de la señal de direccionamiento mitocondrial. En una forma de realización preferida, la detección de la proteína madura se lleva a cabo por inmunotransferencia de extractos de proteína de célula entera usando un anticuerpo específico contra la proteína sensible a oxígeno NifH o contra cualquier etiqueta proteica que forme parte de la proteína de fusión.

En una forma de realización preferida de la invención, la determinación de los niveles de las proteínas de fusión se realiza por inmunofluorescencia cuantitativa. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica basada en microscopía de fluorescencia utilizada principalmente para ensayar muestras biológicas. Esta técnica usa la especificidad de los anticuerpos hacia su antígeno para dirigir colorantes fluorescentes a dianas biomoléculas particulares en una célula, lo que permite por tanto la visualización de la distribución de la molécula diana a través de la muestra. Se puede usar IF en líneas celulares cultivadas, o en células individuales, y se puede usar para analizar la distribución de proteínas, glucanos, y pequeñas moléculas biológicas y no biológicas. Además, también se podría usar IF en combinación con otros métodos, de tinción fluorescente no de anticuerpos, tal como, por ejemplo, DAPI para marcar ADN. Se puede usar más de un anticuerpo al mismo tiempo para detectar, por ejemplo, más de una proteína. Se pueden usar varios diseños de microscopio para el análisis de muestras de IF, tal como el microscopio de epifluorescencia y el microscopio confocal. También se pueden usar varios diseños de microscopios de super-resolución que son capaces de una resolución mucho mayor. En una forma de realización aún más preferida, se lleva a cabo una doble tinción. En dicha doble tinción la proteína sensible a oxígeno NifH de la invención se puede detectar, así como la localización específica de dicha proteína en la célula. Por ejemplo, las células de levadura transfectadas con el polinucleótido o con el vector de expresión de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, el péptido SOD y la proteína GFP se pueden fijar con una solución de paraformaldehído (2-4%) y permeabilizar con TX-100 al 0,1%. La localización mitocondrial de NifH se puede confirmar por medio de tinción específica. La tinción de mitocondrias se puede llevar a cabo por métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen, pero no están limitados a tinción con rodamina 123, tinción de tetrametilrosamina o mitotracker. En una forma de realización preferida, las mitocondrias se detectan por tinción con mitotracker. Brevemente, esta técnica se basa en usar colorantes fluorescentes que tiñen las mitocondrias en células vivas. Las sondas mitotracker específicas están comercialmente disponibles tales como colorantes mitotracker de rosamina que incluyen MitoTrackerR naranja CMTMRos, un derivado de tetrametilrosamina, y MitoTrackerR Rojo CMXRos (Invitrogen), un derivado de X-rosamina. Colorantes MitoTrackerR reducidos, MitoTrackerR naranja CM-H2TMRos y MitoTrackerR rojo CM-H2XRos (No. de Cat. M7513), que son derivados de dihidrotetrametilrosamina y dihidro-X-rosamina (Invitrogen). Estas sondas reducidas no fluorescen hasta entran en las células vivas, donde se oxidan a la correspondiente sonda selectiva de mitocondria fluorescente y después secuestradas en la mitocondria.

Si se desea, el primer método de la invención comprende una etapa adicional que comprende la purificación de dicha proteína sensible a oxígeno NifH. Para conservar la actividad de la proteína de fusión, se recomienda que la purificación se lleve a cabo en condiciones anaerobias. Como se usa en el presente documento, el término "condiciones anaerobias" se refiere a condiciones en donde la concentración de oxígeno está por debajo de 1 ppm. En una forma de realización preferida, NifH es de *A. vinelandii*.

La purificación de la proteína NifH requiere que las células en las que se expresa la proteína se lisen. El experto en la materia entenderá que la purificación se puede llevar a cabo aplicando una única etapa de lisis de modo que todas las membranas biológicas se rompan, incluyendo la membrana celular y las membranas mitocondriales, obteniéndose de esta manera un lisado de células enteras que después se puede procesar adicionalmente para purificar la proteína NifH. De forma alternativa, la purificación se puede llevar a cabo en mitocondrias aisladas, que primero se obtienen de las células mediante una primera etapa de lisis dirigida a lisar la membrana celular y, según pueda ser el caso, la pared celular. Las mitocondrias aisladas se lisan después para obtener un lisado mitocondrial del que se purifica NifH.

Si se desea, las células de *S. cerevisiae* que producen NifH primero se lisan en condiciones anaerobias para aislar dicha proteína. Las células se pueden resuspender en tampón de lisis anaerobio que contiene: fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 1 mM, ditionito de sodio (DTH) 2 mM, DNasa I 5 µg/ml y preferiblemente, cualquier inhibidor de proteasa para causar degradación de proteínas. Las células se pueden lisar en una prensa francesa a 1500 lb/in². Los extractos sin células obtenidos después de eliminar los restos celulares se pueden obtener mediante centrifugación a 17.000 rpm durante 1 hora a 4°C en condiciones anaerobias.

Para aislar y purificar la proteína NifH según la invención, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la purificación de proteínas en condiciones anaerobias (véase, por ejemplo, Curatti et al., 2006, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 103: 5297-5301; Christiansen et al. 1998, Biochemistry 37:12611-12623). En una forma de realización, la proteína de fusión según la invención se aísla usando anticuerpos que pueden unirse específicamente a la proteína NifH o, como puede ser el caso, a la etiqueta de purificación. Los anticuerpos adecuados para el inmunoadsorbimiento de la proteína de fusión incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

En una forma de realización preferida, en esas formas de realización en donde la proteína de fusión comprende además una etiqueta, la purificación de la proteína NifH se lleva a cabo por cromatografía de afinidad usando un reactivo que se une específicamente a dicha etiqueta. En este caso, la etiqueta en la proteína de fusión y el reactivo que muestra afinidad por dicha etiqueta actúan como el primer y segundo miembros de un par de unión, respectivamente.

El término "primer miembro de un par de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene afinidad hacia y "se une" a otra (de aquí en adelante conocida como "segundo miembro del par de unión") en ciertas condiciones, denominadas "condiciones de unión". El primer miembro del par de unión es un péptido (proteína) mientras que el segundo miembro del par de unión puede ser de una naturaleza peptídica o no peptídica.

El término "par de unión" no implica ningún tamaño o cualquier otra característica estructural técnica particular diferente de que dicho par de unión pueda interactuar y unirse al otro miembro del par de unión produciendo un conjugado en donde el primer y segundo componentes están unidos entre sí por medio de las interacciones específicas entre el primer y el segundo miembro de un par de unión. El par de unión incluye cualquier tipo de interacción inmunitaria tal como antígeno/anticuerpo, antígeno/fragmento de anticuerpo, hapteno/antihapteno así como interacciones no inmunitarias tales como avidina/biotina, avidina/moléculas biotiniladas, ácido fólico/proteína que se une a folato, hormona/receptor de hormona, lectina/hidrato de carbono, lectina/molécula modificada con hidratos de carbono, enzima/sustrato enzimático, enzima/inhibidor enzimático, proteína A/anticuerpo, proteína G/anticuerpo, ácidos nucleicos complementarios (incluyendo secuencias de ADN, ARN y ácidos peptidonucleicos (APN)), polinucleótido/proteína que se une a polinucleótidos.

Como se usa en la presente invención, la expresión "unión específica" se refiere a la capacidad de una primera molécula de unirse específicamente a una segunda molécula por medio de la existencia de complementariedad entre las estructuras tridimensionales de las dos moléculas con una afinidad sustancialmente mayor para unión no específica de modo que la unión entre dicha primera y segunda molécula preferiblemente tiene lugar antes que la unión de cualquiera de dichas moléculas con respecto a las otras moléculas presentes en la mezcla de reacción. Se entiende que hay alta afinidad en la unión de dos moléculas cuando el complejo resultante de dicha unión tiene una constante de disociación (KD) de menos de 10⁻⁶ M, menos de 10⁻⁷ M, menos de 10⁻⁸ M, menos de 10⁻⁹ M, menos de 10⁻¹⁰ M, menos de 10⁻¹¹ M, menos de 10⁻¹² M, menos de 10⁻¹³ M, menos de 10⁻¹⁴ M o menos de 10⁻¹⁵ M.

En una forma de realización preferida, NifH, se expresa como fusión que comprende una etiqueta de histidina, en cuyo caso la purificación se puede llevar a cabo usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Esta técnica funciona permitiendo que las proteínas con afinidad por iones metálicos (es decir, la proteína de fusión que comprende NifH fusionada a una etiqueta de histidina) se retengan en una columna que contiene iones metálicos inmovilizados, tal como cobalto, para la purificación de proteínas o péptidos que contienen histidina. Las fracciones eluidas se pueden concentrar después usando un concentrador Vivaspin 500 (Sartorius) con un tamaño de poro límite de 30 kDa como se muestra en el ejemplo 3 de la presente solicitud.

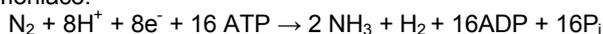
Método para la reconstitución *in vitro* del complejo proteico nitrogenasa activo

El método para la expresión y recuperación de NifH activa según la presente invención permite obtener cantidades de NifH que se pueden usar para la reconstitución el complejo nitrogenasa activo en presencia del complejo NifDK. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para la reconstitución *in vitro* de un complejo proteico nitrogenasa activo que comprende las etapas de:

- i) introducir en una célula eucariota el polinucleótido de la invención o un vector según la invención, en donde la célula comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión

- que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial en donde dicho segundo péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM,
- ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permiten la expresión de las proteínas NifH y NifM,
 - iii) purificar la proteína NifH de dicha célula en condiciones anaerobias, y
 - iv) poner en contacto dicha NifH purificada de la etapa iii) con un complejo NifDK.

El término “complejo proteico” o “complejo” como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Preferiblemente, dichos polipéptidos interactúan entre sí en el mismo tiempo y lugar. Los complejos proteicos son una forma de estructura cuaternaria. Las proteínas en los complejos proteicos están unidas por interacciones proteína-proteína no covalentes, y diferentes complejos tienen diferentes grados de estabilidad con el tiempo. Como se usa en el presente documento, el término “complejo nitrogenasa reconstituido activo” se refiere a un complejo proteico que se formula a partir de recombinantes individuales, aislados que retiene sustancialmente toda la actividad funcional del complejo proteico nitrogenasa nativo del que se aíslan los péptidos. “Actividad nitrogenasa” se refiere a la reacción que el complejo nitrogenasa realiza que es la reducción enzimática de dinitrógeno a amoníaco:



Por tanto, el término “complejo nitrogenasa” se refiere a un complejo proteico que comprende el componente nitrogenasa reductasa o proteína de hierro o componente II de la nitrogenasa o NifH y la proteína de molibdeno-hierro o componente I de la nitrogenasa o NifDK. Dicho complejo cataliza otras reacciones que implican la reducción de sustratos con dobles o triples enlaces, tal como la reducción de acetileno, la reducción del óxido nítrico, reducción de ácido, reducción de cianuro, reducción de sulfuro de carbonilo, reducción de dióxido de carbono, reducción de tiocianato o reducción de cianato.

En una forma de realización preferida, dicho complejo nitrogenasa reconstituido activo tiene una actividad nitrogenasa del al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% con respecto a dicha actividad nitrogenasa del complejo nitrogenasa nativo aislado de *A. vinelandii*; preferiblemente al menos el 90%; preferiblemente al menos el 95%; más preferiblemente al menos el 96%; aún más preferiblemente al menos el 97%; preferiblemente al menos el 98%; más preferiblemente al menos el 99%; aún más preferiblemente al menos el 100%.

La primera etapa del método para la reconstitución *in vitro* de un complejo proteico nitrogenasa activo (de aquí en adelante, el segundo método de invención) comprende introducir en la célula eucariota el polinucleótido de la invención que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH, y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente SOD de *S. cerevisiae*, N-terminal respecto a la proteína NifH. La célula en donde se introduce el polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente SOD de *S. cerevisiae*, en donde dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM, operativamente unido a elementos reguladores adecuados de transcripción o traducción.

Los términos “proteína sensible a oxígeno”, “péptido de direccionamiento mitocondrial”, “NifH” y “NifM” así como sus formas de realización preferidas ya se han definido previamente y aplican igualmente a este aspecto de la invención.

El término “introducir en una célula eucariota el polinucleótido de la invención o introducir en una célula eucariota el vector de expresión de la invención” también se ha definido respecto al método para expresar la proteína NifH en una célula eucariota de la invención y aplica igualmente al segundo método de la invención.

En una forma de realización, el polinucleótido según la invención y que codifica una proteína de fusión que comprende NifH y la señal de direccionamiento mitocondrial se introduce en una célula que ya comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente SOD de *S. cerevisiae*, en donde dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM, operativamente unido a elementos reguladores adecuados de transcripción o traducción. Dicha secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial se puede proporcionar en un plásmido (extracromosómicamente) o integrada en el genoma de la célula huésped.

En otra forma de realización, el polinucleótido según la invención y que codifica una proteína de fusión que comprende NifH y la señal de direccionamiento mitocondrial y el polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial se proporcionan en un único polinucleótido.

La segunda etapa del segundo método de la invención comprende hacer crecer dichas células transformadas en condiciones que permiten la expresión de ambas proteínas, NifH y NifM. Dichas condiciones adecuadas para la expresión de dichas proteínas incluyen condiciones que sean las que permiten un crecimiento óptimo de la célula eucariota y las que permiten la expresión de proteínas en dichas células. Las condiciones para la optimización del cultivo de células eucariotas y la expresión de dicha proteína heteróloga se han descrito anteriormente para el método para expresar la proteína NifH en una célula eucariota según la invención y aplican igualmente para este

aspecto de la invención. Los métodos para seguir si se ha producido suficiente cantidad de NifH se definen en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al presente método.

5 El método para la reconstitución *in vitro* de un complejo proteico nitrogenasa activo de la invención comprende una tercera etapa que comprende la purificación de la proteína NifH en condiciones anaerobias. En una forma de realización preferida, dicha proteína es NifH de *A. vinelandii*. Los métodos y condiciones para la purificación de la proteína NifH en condiciones anaerobias se han detallado anteriormente en el primer método de la invención y aplican igualmente al segundo método de la invención.

10 La cuarta etapa del segundo método de la invención comprende poner en contacto la proteína NifH purificada de la etapa (iii) con un complejo NifDK. El término "complejo NifDK" como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína heterotetramérica formada por dos dímeros $\alpha\beta$ ($\alpha_2\beta_2$) que lleva un cofactor de hierro-molibdeno en el sitio activo de cada subunidad α . Dicho complejo proteico es el producto de los genes *nifD* y *nifK*. En una forma de realización preferida el complejo NifDK se aísla de *A. vinelandii*. El término "aislado de" se ha definido anteriormente y aplica igualmente a este aspecto de la invención. Por tanto, en una forma de realización preferida, el gen *nifD* tiene origen de *A. vinelandii*. El gen *nifD* codifica la subunidad α del complejo proteico NifDK. La secuencia de la proteína codificada por el gen *nifD* de *A. vinelandii* está disponible en la base de datos Uniprot con el número de acceso P07328 (23 de enero, 2007). El gen *nifK* codifica la subunidad β del complejo proteico NifDK. En una forma de realización preferida, el gen *nifK* tiene origen de *A. vinelandii*. La secuencia de la proteína codificada por el gen *nifK* de *A. vinelandii* está disponible en la base de datos Uniprot con el número de acceso P07329 (23 de enero, 2007).

25 Los métodos y condiciones para crecer *A. vinelandii* se conocen bien en la técnica. Las células se pueden hacer crecer en concentración limitante de NH_4^+ (100 μg como acetato de amonio) a 30°C. *A. vinelandii* está desreprimida para nitrogenasa en medio sin fuente de nitrógeno. Las células se pueden recoger a las 2 horas después del agotamiento del amonio. Una vez que el complejo nitrogenasa se ha desreprimido, dicho complejo NifDK de *A. vinelandii* se puede purificar en condiciones anaerobias por técnicas que conoce bien el experto en la materia (Christiansen et al. 1998, Biochemistry 37:12611-12623). NifDK se puede purificar de extractos sin células de *A. vinelandii* por cromatografía de afinidad a una resina de Co^{2+} en condiciones anaerobias dentro de una caja seca. Para mantener las condiciones anaerobias los tampones para la purificación y análisis de proteínas se pueden rociar con N_2 purificado durante 20-30 minutos. Los extractos sin células de *A. vinelandii* se pueden preparar mediante choque osmótico seguido por centrifugación a 30.000 \times g durante 1 hora para eliminar los restos celulares. Los extractos sin células se cargan en una columna de afinidad de Co^{2+} de 20 ml equilibrada en fosfato de sodio 10 mM, tampón fosfato de potasio 1,8 mM (pH 7,3), NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, glicerol al 10%. La columna se lava con 200 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), NaCl 500 mM, imidazol 25 mM, y el complejo proteico NifDK se eluye de la columna aplicando 40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), NaCl 150 mM, imidazol 300 mM. Si se desea, NifDK eluido se puede concentrar mediante ultracentrifugación a través de una membrana YM10 en una célula Amicon en una atmósfera de N_2 y después someter a un ciclo de dilución-concentración en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), NaCl 150 mM, para eliminar el imidazol residual. Un procedimiento típico de purificación dio 100 mg de NifDK a partir de 340 g de pasta de células. La pureza del complejo proteico NifDK se puede estimar por medio de análisis de SDS/PAGE.

40 El término "poner en contacto la proteína NifH purificada de la etapa (iii) con "un complejo NifDK", como se usa en el presente documento se refiere a la incubación de dicha proteína NifH purificada y dicho complejo proteico NifDK en condiciones adecuadas para la interacción entre dichas proteínas; lo que produce así la formación del complejo proteico nitrogenasa de la invención.

50 Las condiciones en las que se lleva a cabo la NifH purificada y el complejo NifDK incluye una relación molar específica entre dichos componentes NifH y NifDK de la reacción. El término "relación molar" como se usa en el presente documento se refiere a la relación entre las cantidades en moles de cualesquiera dos compuestos (es decir, NifH/NifDK) implicados en una reacción química. En una forma de realización, dicha relación molar está relacionada con la relación entre las cantidades en moles de dichos dos compuestos en donde se alcanza el máximo rendimiento de la reacción. En una forma de realización preferida, dicha relación molar entre NifH/NifDK es al menos 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 o más.

55 La detección de dicho complejo proteico se puede llevar a cabo por cualquier método que permita la detección de la interacción entre la proteína NifH y el complejo NifDK. De forma alternativa, la detección del complejo proteico se puede llevar a cabo detectando la actividad enzimática del complejo nitrogenasa resultante.

60 Los métodos adecuados para detectar la existencia de una interacción entre la proteína NifH y el complejo NifDK incluyen cualquier método conocido en la técnica para detectar la interacción proteína-proteína incluyendo coimmunoprecipitación, inmunotransferencia de afinidad, ensayos de precipitación, FRET y similares.

65 En el caso de que la formación del complejo que contiene las proteínas NifH y NifDK se determine midiendo la actividad nitrogenasa, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para detectar la reducción enzimática de dinitrógeno a amoniaco en donde se transfieren electrones del componente NifH al complejo proteico NifDK. Las

condiciones óptimas que permiten la actividad nitrogenasa se detallan en el ejemplo 6 de la presente invención. Los métodos para determinar si dicho complejo nitrogenasa es un complejo enzimático activo se conocen bien en la técnica y se pueden usar (sin limitación) en la presente invención. Si se desea, se puede estimar la actividad fijadora de nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetilo. Brevemente, esta técnica es un método indirecto que usa la capacidad del complejo nitrogenasa para reducir sustratos con triples enlaces. La enzima nitrogenasa reduce el gas acetileno a etileno. Ambos gases se pueden cuantificar usando cromatografía de gases. Se mide la fijación e incorporación de 15 N_2 mediante espectrofotometría de emisión o espectrometría de masas. Otro método para medir la fijación de nitrógeno es mediante análisis de CHN, digestión/oxidación de Kjeldahl, y técnicas de combustión catalítica a altas temperaturas que mide la acumulación de nitrógeno en partículas, disuelto o materia orgánica total.

Kit de la invención

Además, la presente invención se refiere a un kit útil para poner en práctica la invención divulgada en el presente documento.

- i) un polinucleótido según la invención o un vector de expresión según la invención; y
- ii) reactivos adecuados para expresar la proteína NifH en una célula eucariota y/o reactivos para llevar a cabo el método para la reconstitución *in vitro* del complejo proteico nitrogenasa activo en una célula eucariota según la invención.

En la presente invención un "kit" se entiende como un producto que contiene los diferentes reactivos y el material para expresar la proteína NifH en una célula eucariota según el método de la invención. El término kit también abarca un producto que contiene los diferentes agentes y material para la reconstitución *in vitro* de un complejo proteico nitrogenasa activo en una célula eucariota según la invención. Los ejemplos ilustrativos de reactivos útiles para llevar a cabo los métodos de la invención son medio para mantener las células, tampones, solución salina, etc. En una forma de realización preferida, el kit según la invención comprende además un sustrato de nitrogenasa. Como se usa en el presente documento el término "sustrato de nitrogenasa" se entiende como el reactivo que se consume durante la reacción catalizada por la enzima nitrogenasa. Los ejemplos de sustratos de nitrogenasa son, sin limitación, gas nitrógeno (N_2), óxido nitroso (N_2O), cianuro, monóxido de carbono, isocianato de metilo, acida, acetileno, ciclopropano, cianamida, diazirina. En una forma de realización aún más preferida, dicho sustrato de nitrogenasa es acetileno. En otra forma de realización aún más preferida, dicho sustrato de nitrogenasa es gas nitrógeno (N_2).

Otro componente que puede estar presente en el kit es un embalaje que permita mantener los agentes apropiadamente almacenados. Los materiales adecuados para preparar tales embalajes incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, bolsitas y similares. El kit de la invención puede contener además instrucciones para usar los agentes en el método para expresar la proteína NifH en una célula eucariota de la invención y/o instrucciones para usar agentes en el método para reconstituir *in vitro* un complejo proteico nitrogenasa activo. Dichas instrucciones se pueden encontrar en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico que puede almacenar las instrucciones de modo que las pueda leer un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener de forma alternativa o adicional sitios web en internet que proporcionan tales instrucciones.

La invención se detalla a continuación por medio de los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y por ningún medio limitantes para el ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Crecimiento de cepas y medios de cultivo. Se cultivaron *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a (MATa {*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*}) y cepas derivadas construidas en el presente documento a 30°C y 200 rpm en medio YPD (extracto de levadura al 1%, bacto-peptona al 2%, glucosa al 2%) o en medio SD mínimo (base de nitrógeno de levadura al 7,7% y glucosa al 2%) suplementado con requisitos auxotróficos (véase, Sherman, F. et al., 1986, *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Se usó *Escherichia coli* DH5 α para almacenamiento y amplificación de vectores de expresión de levadura. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina cuando era necesario.

La cepa de *Azotobacter vinelandii* DJ se cultivó en medio modificado de Burk suplementado con acetato de amonio 29 mM a 30°C con agitación (200 rpm). La desrepresión de nitrogenasa se llevó a cabo después de eliminar el acetato de amonio del medio como se describe en Shah et al. (Shah et al, 1972, *Biochim Biophys Acta*, 256:498-511).

Ejemplo 1Construcciones de ADN y generación de cepas de *S. cerevisiae*

Los genes *nifH* y *nifM* de *A. vinelandii* se sintetizaron con optimización de codones para *S. cerevisiae* (GenScript, EE UU). El extremo N-terminal de *nifH* lleva secuencias de ADN que codifican una señal que lleva a la mitocondria de superóxido dismutasa duplicada de *S. cerevisiae* (*mlsSOD2*) y una etiqueta de ocho histidinas. El gen *nifM* lleva una *mlsSOD2* N-terminal y secuencias que codifican una etiqueta Flag. Para determinar la localización celular de NifH y NifM, se sintetizaron construcciones de ADN que incluían *mlsSOD2* N-terminal, un motivo tetracisteína (*cys₄*), y secuencias que codifican yEGFP o mKO, respectivamente. Las construcciones sintéticas se clonaron en los sitios de multiclonación dual del vector pESC-His (Agilent Technologies) usando técnicas estándar.

La transformación de *S. cerevisiae* W303-1A se llevó a cabo según Chen et al. (Chen et al., 1992 Biochim Biophys Acta, 1171:219-223). La cepa GF1 lleva *mlsSOD2-flag-nifM* bajo el control de GAL10p en pESC-His. La cepa GF2 lleva tanto GAL1p::*mlsSOD2-his₈-nifH* como GAL10p::*mlsSOD2-flag-nifM* en pESC-His. La cepa GF3 lleva GAL1p::*mlsSOD2-gfp-nifH-cys₄* en pESC-His. La cepa GF4 lleva GAL10p::*mlsSOD2-cys₄-nifM-mKO* en pESC-His.

Ejemplo 2Inducción de la expresión de NifH y NifM

Se prepararon cultivos de inoculación haciendo crecer *S. cerevisiae* a 30°C y 200 rpm en matraces de 1 litro que contenían 500 ml de medio SD suplementado con requisitos auxotróficos hasta una DO₆₀₀ de 0,6. Para los experimentos de purificación de proteínas, las células de *S. cerevisiae* se cultivaron en lotes de 4 litros de medio YPD en un fermentador de 5 litros (Biostat B Plus, Sartorius) hasta que la glucosa se consumió, momento en el que se añadió galactosa al 2% para inducir la expresión de NifH y NifM, y se recogieron 72 horas después de la adición de galactosa. Las células se recogieron a 4°C por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos, y después se congelaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 3Purificación de NifH

Se resuspendieron células de *S. cerevisiae* GF2 en un tampón de lisis anaerobio que contenía: fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 1 mM, ditionito de sodio (DTH) 2 mM, DNasa I 5 µg/ml, y la mezcla de inhibidores de proteasas de levadura (Sigma). Las células se lisaron en una prensa francesa a 1500 lb/in². Se obtuvieron extractos sin células después de eliminar los restos celulares por centrifugación a 17.000 rpm durante 1 hora a 4°C en condiciones anaerobias.

La proteína NifH se purificó por cromatografía de afinidad en cobalto en condiciones anaerobias (<0,1 ppm de O₂) dentro de una caja seca MBraun. El extracto sin células se cargó a 0,2 ml/min en una columna rellena con 20 ml de resina Talon (Clontech), preequilibrada con tampón de lisis, usando un sistema de FPLC AKTA Prime (GE Healthcare). La columna se lavó después con tampón de lavado (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 50 mM). Por último, la proteína unida se eluyó con tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 150 mM) y se recogió en dos fracciones de 40 ml. Las fracciones eluidas se concentraron usando un concentrador Vivaspin 500 (Sartorius) con un tamaño de poro límite de 30 kDa, y después se desalaron en una columna de desalado HiPrep 26/10 (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM. Se congeló NifH purificada como gotitas en nitrógeno líquido.

Ejemplo 4Determinación de las condiciones anaerobias

Se determinaron las condiciones anaerobias mediante la actividad aconitasa en extractos sin células según Kennedy et al. (Kennedy et al., 1983, J. Biol. Chem, 258, 11098-11105). Se determinó la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinonínico (Pierce), con seroalbúmina bovina como estándar. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con lauril sulfato sódico (SDS-PAGE) como se describe en Laemmli (Laemmli, 1970 Nature 227:680-685). El análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo con anticuerpos generados contra la proteína NifH de *A. vinelandii*.

La figura 2 muestra la actividad aconitasa en extractos sin células de células GF2 inducidas. La presencia de actividad de la enzima aconitasa mitocondrial indica la falta de condiciones de agresión de oxígeno durante la inducción de galactosa.

Ejemplo 5

Colocalización de las proteínas NifH y NifM en mitocondria por microscopía confocal

5 Se cultivaron las cepas GF3 y GF4 de *S. cerevisiae* a 30°C en matraces de 1 litro que contenían 500 ml de medio SD suplementado con requisitos auxotróficos hasta una DO_{600} de 0,6. Las células se recogieron después por centrifugación, se lavaron con medio SD sin glucosa, se resuspendieron en medio SD suplementado con galactosa al 2% para inducir la expresión de NifH y NifM, y se incubaron en las mismas condiciones durante 48 horas.

10 Las células inducidas se recogieron a 4°C por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y después se resuspendieron en tampón de resuspensión de levadura que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, glicerol al 10% y PMSF 1 mM. Se analizó la fluorescencia de la célula entera usando un microscopio confocal Leica TCS SP8 equipado con un objetivo de inmersión en agua 40x/1,1. Se usaron separadores del haz de excitación DD 488/514 y DD 488/561 para capturar imágenes de localización detallada de las proteínas de fusión yEGFP-NifH y NifM-mKO, respectivamente. En paralelo, las células inducidas con galactosa se trataron con Mito Tracker Deep Red según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) para teñir mitocondrias. La cuantificación de la fluorescencia de yEGFP y mKO en mitocondrias de células inducidas se presenta en la figura 1.

Ejemplo 6Determinación de la actividad de NifH

20 La actividad de las preparaciones de NifH purificadas de células de *S. cerevisiae* GF2 se analizó rutinariamente mediante el ensayo de reducción de acetileno después de la adición de exceso de NifDK y mezcla regeneradora de ATP (ATP 1,23 mM, fosfocreatina 18 mM, MgCl₂ 2,2 mM, Na₂S₂O₄ 3 mM, y 40 µg de creatina fosfoquinasa). Las reacciones de control positivo se llevaron a cabo con proteínas NifH y NifDK purificadas de *A. vinelandii* en condiciones anaerobias como se describe en Curatti et al. (Curatti et al., 2007, Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 104: 17626-17631). La actividad específica máxima de 1600 nanomoles de etileno formado·min⁻¹·miligramo de proteína⁻¹ se obtuvo a una relación molar NifH/NifDK de 40 (figura 3).

30 Para cuantificar la actividad productora de NH₃ de nitrogenasa con NifH recombinante se evacuó gas argón de viales de reacción y se sustituyó por N₂ a 1 atm. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante 60 minutos y después se pararon mediante la adición de EDTA 50 mM. El NH₃ producido se determinó por fluorescencia cromatográfica líquida usando un HPLC Agilent 1200 y un detector de fluorescencia Jasco FP-920 según Corbin et al. (Corbin et al., 1984, Appl. Environ. Microbiol., 1027-1030). La actividad específica de 869 nanomoles de amoníaco formado·min⁻¹·miligramo de proteína⁻¹ se obtuvo a una relación molar aparente NifH/NifDK (de *S. cerevisiae* y *A. vinelandii*, respectivamente) de 40. Las reacciones de control positivo se llevaron a cabo con proteínas NifH y NifDK purificadas de *A. vinelandii* en condiciones anaerobias (véase la tabla 1).

40 Tabla 1: Actividad específica de amoníaco formado por NifH recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (yNifH) y NifDK de *Azotobacter vinelandii*. (_{Avi}NifH/NifDK)

	URF ¹	Amoníaco (nmol/ml)	Actividad específica (nmol de amoníaco min ⁻¹ ·miligramo de NifDK ⁻¹)
_{Avi} NifH/NifDK	1304	179	766
yNifH	1456	200	869
NifDK	11	1,5	0
Estándar 0	12	0	-
Estándar 50	328	50	-
Estándar 100	731	100	-
Estándar 500	3623	500	-

Los estándares y controles apropiados se corrieron cada vez. El control positivo es la actividad máxima de NifDK obtenida a la relación molar NifH/NifDK de 40. Ambos componentes se purificaron de *Azotobacter vinelandii*. La corrección para el fondo del reactivo ya se ha hecho.

45 ¹URF: Unidades relativas de fluorescencia.

Lista de secuencias

<110> Universidad Politécnica de Madrid

50 <120> REACTIVOS Y MÉTODOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SENSIBLES A OXÍGENO

<130> P9452PC00

<150> EP13382352
 <151> 11-09-2013

<160> 7

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de direccionamiento mitocondrial de superóxido dismutasa (SOD) de *S. cerevisiae*

15 <400> 1
Met Phe Ala Lys Thr Ala Ala Ala Asn Leu Thr Lys Lys Gly Gly Leu
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser
20

<210> 2
 20 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Péptido de direccionamiento mitocondrial que comprende dos copias en tándem de SOD de *S. cerevisiae*

<400> 2
Met Phe Ala Lys Thr Ala Ala Ala Asn Leu Thr Lys Lys Gly Gly Leu
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser Met Phe Ala Lys Thr Ala Ala Ala Asn Leu Thr Lys
20 25 30

Lys Gly Gly Leu Ser Leu Leu Ser
35 40

30 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia de etiqueta

<400> 3
Ala His Gly His Arg Pro
1 5

40 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> secuencia de etiqueta

<400> 4

ES 2 663 834 T3

Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser
 1 5 10

- <210> 5
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de etiqueta
- <220>
- <221> INSEGURO
- <222> (5)..(6)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 5
- Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys
- 1 5
- <210> 6
- 20 <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> motivo tetracisteína
- <220>
- <221> INSEGURO
- <222> (3)..(4)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 6
- Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys
- 1 5
- <210> 7
- 35 <211> 1749
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Polinucleótido que codifica la proteína de fusión sod2-GFP-NifH
- <400> 7

ES 2 663 834 T3

atgttcgcta agacagccgc cgctaacttg acaaagaagg gtggtttgtc attgctctct 60
 atgttcgcaa agactgccgc agctaactta actaagaaag gtggtttgtc attgctcagt 120
 atgtcaaagg gtgaagaatt gtttactggg gttgtaccaa tcttggtaga attagatggg 180
 gacgtcaatg gtcataaatt ctocgtagt ggtgaagggtg aaggtagcgc aacatacggg 240
 aaattgacct tgaagtttat atgtactact ggtaaattgc cagttccttg gccaacattg 300
 gtaaccactt ttggttatgg tgttcaatgc ttcgccagat accctgatca tatgaaacaa 360
 cacgactttt tcaagtccgc tatgccagaa ggttacgttc aagaaagaac tattttcttt 420
 aaggatgacg gtaactacaa gaccagagct gaagtaaagt tcgaagggtga cactttggtc 480
 aacagaatcg aattgaaggg tatcgatttc aaggaagacg gtaacatatt gggtcataag 540
 ttggaataca attacaactc acacaacgta tacatcatgg ctgataagca aaagaatggg 600
 attaaagtca acttcaagat cagacataac atcgaagatg gttccgttca attagcagac 660
 cactatcaac aaaatacccc tattgggtgac ggtcctgttt tgttaccaga caaccattac 720
 ttatocactc aaagtgcttt gtctaaagat ccaaatgaaa agagagacca tatggtcttg 780
 ttagaatttg ttactgctgc aggtattaca cacggtatgg atgaattgta taaagccgcc 840
 gcggggacaa tggccatgag acaatgtgct atctacggta aagggtggtat tggtaaaagt 900
 acaaccactc aaaacttggg tgccgcttta gcagaaatgg gtaaaaagggt catgattggt 960
 ggttgcgatc ctaaggccga ctcaactaga ttgatattac actccaaagc tcaaaataca 1020
 atcatggaaa tggcagccga agcaggtacc gttgaagatt tgggaattgga agacgtattg 1080
 aaggccgggt atgggtggtg aaaatgtgtc gaatctggtg gtccctgaacc aggtgtcggg 1140
 tgcgcaggta gaggtgttat aactgccatc aatttcttgg aagaagaagg tgcatacгаа 1200
 gatgacttag atttcgtttt ctacgatgta ttgggtgacg tcgtttgtgg tggttttgct 1260
 atgccaatta gagaaaacaa ggcacaagaa atctatatag tttgcagtgg tgaaatgatg 1320
 gctatgtacg ctgcaaacaa catctctaag ggtatagtca agtacgcaa ttctggttca 1380
 gttagattgg gtggtttgat ctgtaactca agaaacactg atagagaaga cgaattgatt 1440
 atagccttag ctaacaaatt gggtagacaa atgatccatt tcgtacctag agataatgta 1500
 gtccaaagag ctgaaatcag aagaatgaca gttatcgaat atgatccaaa agctaagcaa 1560
 gcagacgaat acagagcatt ggccagaaag gttgtagata ataagttggt agttatacct 1620
 aacccaatca ctatggatga attggaagaa ttgttgatgg aattcgggtat catggaagtt 1680
 gaagatgaat ctatagtcgg taaaactgct gaagaagtag gtagtagtgg ttgttgccca 1740
 ggttggtgt 1749

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína sensible a oxígeno y un péptido de direccionamiento mitocondrial, en donde dicha proteína sensible a oxígeno es NifH.
2. El polinucleótido según la reivindicación 1, en donde dicha proteína sensible a oxígeno es de un organismo procariota, más preferiblemente dicho organismo procariota es *Azotobacter vinelandii*.
3. El polinucleótido según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal a la proteína sensible a oxígeno, y/o preferiblemente dicho péptido de direccionamiento mitocondrial comprende el péptido de direccionamiento mitocondrial de superóxido dismutasa.
4. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de fusión comprende además al menos una etiqueta peptídica adecuada para la detección o purificación de la proteína sensible a oxígeno.
5. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las secuencias que codifican la proteína de fusión tienen los codones optimizados para la expresión en una célula eucariota, preferiblemente en una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.
6. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además elementos reguladores transcripcionales operativamente unidos a dicho polinucleótido o elementos reguladores de traducción operativamente unidos a la proteína de fusión codificada por dicho polinucleótido.
7. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un segundo péptido de direccionamiento mitocondrial, preferiblemente dicho segundo péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM, y más preferiblemente dicho segundo péptido de direccionamiento mitocondrial comprende el péptido de direccionamiento mitocondrial de superóxido dismutasa.
8. El polinucleótido según la reivindicación 7 en donde las secuencias que codifican la proteína de fusión que comprende la proteína NifM tienen codones optimizados para la expresión en una célula eucariota, preferiblemente en una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.
9. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 que comprende además elementos reguladores transcripcionales operativamente unidos al polinucleótido que codifica la proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial o elementos reguladores de traducción operativamente a dicha proteína de fusión.
10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una célula eucariota que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un vector de expresión según la reivindicación 10, preferiblemente dicha célula eucariota crece en condiciones aerobias y/o más preferiblemente dicha célula eucariota es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.
12. Método para expresar NifH en una célula eucariota que comprende las etapas de:
 - i) introducir en dicha célula un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un vector según la reivindicación 10,
 - ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permiten la expresión de dicha proteína sensible a oxígeno y, si se desea,
 - iii) purificar dicha proteína sensible a oxígeno en condiciones anaerobias.
13. Método para la reconstitución *in vitro* de un complejo proteico nitrogenasa activo que comprende las etapas de:
 - i) introducir en dicha célula un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un vector según la reivindicación 10, en donde la célula comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial en donde dicho segundo péptido de direccionamiento mitocondrial está N-terminal respecto a NifM,
 - ii) hacer crecer dicha célula en condiciones que permiten la expresión de las proteínas NifH y NifM,
 - iii) purificar NifH de dichas células en condiciones anaerobias y
 - iv) poner en contacto dicha NifH purificada del paso (iii) con el complejo NifDK;

- 5 preferiblemente la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifM y un péptido de direccionamiento mitocondrial se proporciona en el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína NifH y un péptido de direccionamiento mitocondrial; más preferiblemente dicho complejo NifDK se aísla de *Azotobacter vinelandii*, y/o aún más preferiblemente, la relación molar NifH/NifDK es de al menos 10.
14. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un vector de expresión según la reivindicación 10 o una célula eucariota según la reivindicación 11 para expresar NifH.
- 10 15. Un kit que comprende:
- 15 i) un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un vector de expresión según la reivindicación 10;
- ii) reactivos adecuados para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13; y
- iii) preferiblemente comprende además un sustrato de nitrogenasa.

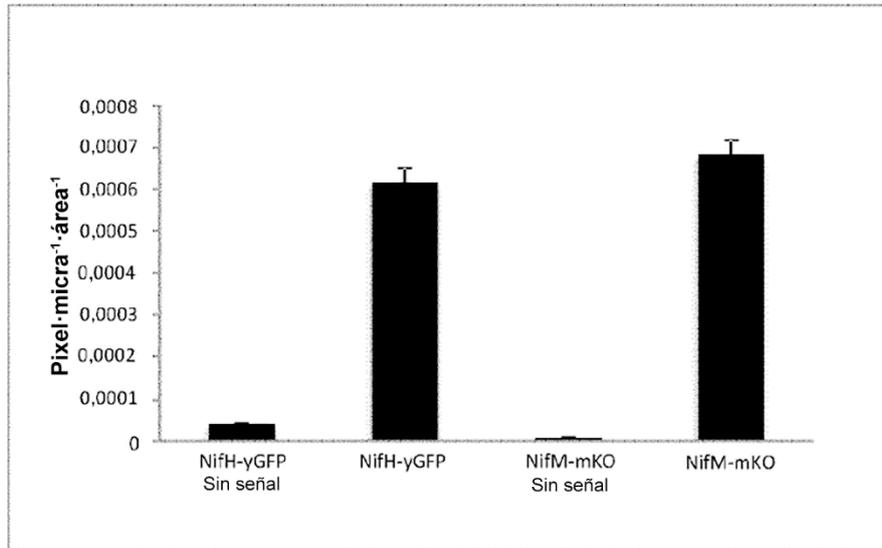


Fig. 1

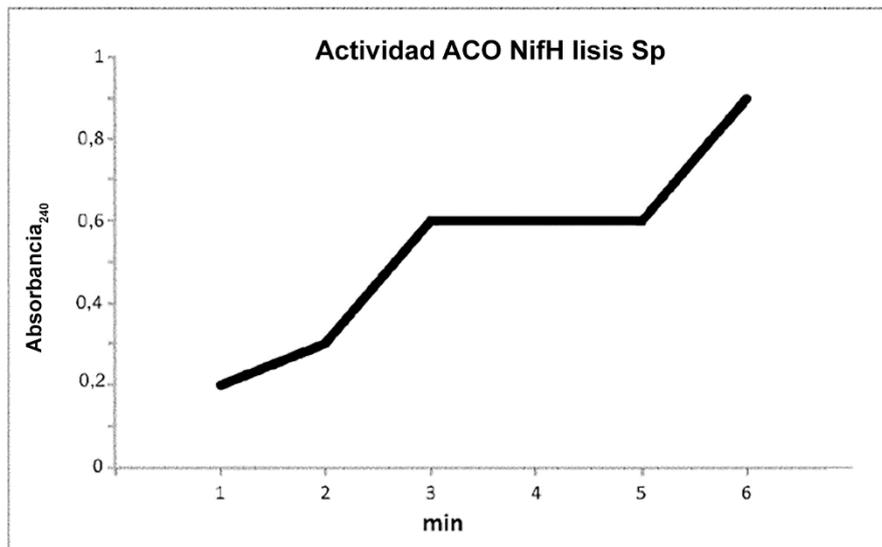


Fig. 2

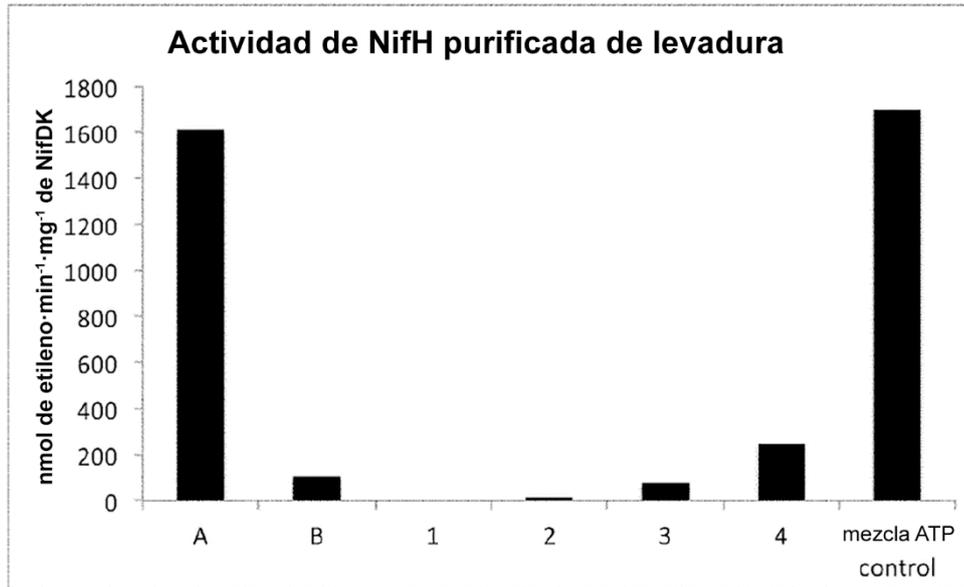


Fig. 3