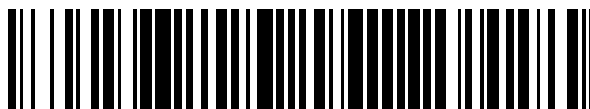


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 227**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2015 PCT/EP2015/062508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2015 E 15725389 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3152310**

54 Título: **Vías de señalización procariótica de 2 componentes para uso como puertas lógicas en células de mamíferos**

30 Prioridad:

05.06.2014 EP 14171271

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

03.11.2020

73 Titular/es:

**ETH ZURICH (100.0%)
Raemistrasse 101/ETH Transfer
8092 Zurich, CH**

72 Inventor/es:

**BENENSON, YAAKOV;
HANSEN, JONATHAN y
KUMAR SWAMINATHAN, KRISHNA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 791 227 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

Vías de señalización procariótica de 2 componentes para uso como puertas lógicas en células de mamíferos

Las vías de señalización son la interfaz principal de la célula con el ambiente y muchas estrategias han evolucionado para la señalización en los diferentes reinos de la vida. Funcionalmente, todas las vías de señalización comparten atributos comunes, tal como i) un receptor de membrana que responde a un ligando externo; ii) un número de componentes corriente abajo usados para amplificar señales débiles, filtrar ruido, agudizar la respuesta, realizar adaptaciones, etc., y iii) en el extremo receptor, motivos genéticos y proteicos adecuados.

Virtualmente todas estas vías usan transferencia de fosforilo catalítica postraducción para transmitir información, generando escalas de tiempo de respuesta mucho más rápidas en comparación con el control transcripcional y postranscripcional. Dado que los sistemas están basados en interacciones proteína-proteína, la modularidad sustancial ha evolucionado con decenas, si no cientos, de vías codificadas y expresadas simultáneamente en los genomas celulares. Al mismo tiempo, esta modularidad está complementada con la comunicación intervívia a través de comunicación cruzada y una plétora o relaciones de entrada-salida de uno a muchos o de muchos a uno. En el contexto de la biología sintética, la señalización representa un caso desafiante. Debido a su uso pesado de proteínas, cualquier modificación de la vía requiere una nueva manipulación de proteínas o diseño de novo de la proteína.

Por consiguiente, el "trasplante de la vía transreino", que, como su nombre implica, incluye trasplante de una vía de un donante distinto en términos evolutivos en la célula huésped, puede ser usado para solucionar este problema. El nuevo diseño de una vía nativa frecuentemente conlleva un riesgo de interacciones indeseadas con las otras vías. Sin embargo, la introducción de una vía completamente extraña idealmente del donante que sea lo más divergente posible del receptor, puede minimizar este riesgo. La aplicación de recombinasas derivadas de fago y reguladores de transcripción de base procariótica es conocida de la técnica anterior.

Las vías de señalización de dos componentes (TCS) son ubicuas en procariotas, que comprenden en su forma más simple un sensor y componentes reguladores. El sensor quinasa de histidina (HK) tiene dominios extracelulares y citoplasmáticos ligados a través de un dominio de transmembrana. Tras la unión al ligando, normalmente al dominio extracelular y el posterior cambio conformacional, tiene lugar la autofosforilación del residuo conservado de histidina en el dominio citoplasmático. Después, el fosfato es transferido al residuo aspártico en el regulador de respuesta (RR), induciendo un cambio de conformación que usualmente facilita la unión al ADN. De este modo, el RR fosforilado, homodimerizado, puede ser unido a un motivo de ADN adecuado y modular la expresión genética. En otros casos, tal como quimiotaxis, la señalización de dos componentes genera modificaciones postraducción de proteínas corriente abajo. El proceso bioquímico de la transferencia de fosforilo de una histidina al residuo de aspartato se encuentra en plantas y eucariotas bajos, mientras que es mínimo hasta ausente en los vertebrados, en los que es regla la fosforelay de tirosina-serina/treonina.

La presente invención se refiere a la implementación de señalización procariótica en células de mamífero. Es conocido en la técnica el recableado y la aplicación sintética en las células procarióticas (Levskaya *et al.*, Nature, 2005, 438(7067), 441-442; Skerker *et al.*, Cell 2008, 133(6), 1043-1054; Tabor *et al.*, Cell 2009, 137(7), 1272-1281) así como Arabidopsis (Ninfa *et al.*, COiM 2010, 13(2), 240-245; Antunes *et al.*, Plos ONE 6(1)). Mientras que Urao *et al.* (Plant Cell, 1999, 11(9), 1743-1754) enseña la complementación funcional por una HK derivada de las plantas en la levadura. Sin embargo, la adaptación de un sistema de TCS a las células de mamíferos no es conocida en la técnica. Esta invención desvela tal adaptación y enseña que el núcleo interno de las vías y sus interacciones específicas continúa siendo funcional en células de mamíferos. Al mismo tiempo, la detección de entradas extracelulares no ha sido observada. Los módulos trasplantados pueden ser usados para implementar programas lógicos complejos de expresión genética. Además, los genes de vía pueden servir como una fuente rica de bloques de construcción ortogonales para diseñar circuitos genéticos en células de mamíferos.

Close *et al.*, PLoS One vol 5(8), e12441, 2010, describen el trasplante del operón de Luciferasa en las células de mamíferos.

Zhang *et al.*, Nature Biotechnology, vol 29(2), 149-153, 2011 describen que los efectores similares al activador de transcripción de los Xantomonas, que no existen en mamíferos, son funcionales en células de mamíferos.

Rickman *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, vol 314(1), 259-267, 2004, describen TCS en *Mycobacterium tuberculosis*, que es un patógeno intracelular que infecta células de mamíferos.

El problema subyacente a la presente invención es proporcionar vías de señalización ortogonales diseñadas para uso en células de mamíferos. Este problema es resuelto mediante el tópico de las reivindicaciones independientes.

Términos y definiciones

En el contexto de la presente memoria, el término "ortogonal" se refiere a la independencia de una vía de señalización o una parte de esta a otras vías de señalización. En otras palabras, una vía de señalización ortogonal no experimenta comunicación cruzada con otras vías de señalización endógenas.

En el contexto de la presente memoria, el término "puerta lógica biológica" se refiere a una vía de señalización que integra señales análogas a las compuertas lógicas electrónicas con una actividad de producción que es activada solo tras la estimulación con la combinación adecuada de entradas. De acuerdo con la combinación de señales de entrada requeridas para generar una señal de salida son definidas diferentes clases de puertas lógicas (AND, OR, NOR, NAND, etc.). En la Tabla 1 son presentados ejemplos de señales de entrada requeridas para diferentes clases de puertas lógicas. Dado que las puertas lógicas electrónicas pueden estar unidas por cable para generar una diversidad infinita de circuitos complejos, las puertas lógicas biológicas pueden ser combinadas para generar sus diversos circuitos de control.

Tabla 1: Un valor de 0 significa inactivo y 1 significa activo

Tipo	Entrada		Salida
	1	2	
AND	0	0	0
	0	1	0
	1	0	0
	1	1	1
OR	0	0	0
	0	1	1
	1	0	1
	1	1	1
NOR	0	0	1
	0	1	0
	1	0	0
	1	1	0
NAND	0	0	1
	0	1	1
	1	0	1
	1	1	0

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, es proporcionada una célula de mamíferos que comprende una vía de señalización procariótica de dos componentes (TCS). Esta TCS comprende una proteína activadora A, en la que dicha proteína activadora A es un sensor histidina quinasa que comprende un residuo de histidina, que activa una proteína B reguladora de respuesta (RR), en la que dicha proteína B RR es un regulador transcripcional que comprende un residuo de ácido aspártico, y en la que la activación de dicha proteína B RR por dicha proteína activadora A es llevada a cabo por transferencia de un fosfato de dicho residuo de histidina a dicho residuo de ácido aspártico, y un gen C de salida que está ligado operativamente a un promotor. La proteína B RR activada es capaz de activar el promotor relacionado al gen C de salida y la expresión del gen C de salida define al menos un primer estado (0, sin transcripción) y un segundo estado (1, transcripción detectable).

En ciertas realizaciones, la proteína A activadora es una molécula de histidina quinasa seleccionada de envZ, NarX, DcuS y los ejemplos en la Figura 5.

En ciertas realizaciones, la proteína B RR es un regulador transcripcional seleccionado de ompR, NarL, DcuR y los ejemplos en la Figura 5.

En ciertas realizaciones el gen de salida codifica un reportero fluorescente, una proteína o microARN que afecta la función celular o el estado interno. En ciertas realizaciones el gen C de salida es amcyan.

En ciertas realizaciones, la proteína A activadora puede estar constitutivamente activa o ser activada por señales de entrada. Las señales de entrada son seleccionadas de: quinonas, nitrato, nitrito, citrato, isocitrato, fumarato, succinato,

malato, indol, serina, aspartato, quimioatrayentes, oxígeno, monóxido de carbono, óxido nitroso, luz azul, vancomicina, potasio, moléculas de detección de quórum, cambio de temperatura, iones de sulfato, ácido nicotínico, cambios en la osmolaridad, tolueno, O-xileno, glutamina, 2-cetoglutarato, magnesio.

- 5 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, es proporcionada una puerta lógica biológica AND manipulada. La puerta lógica AND comprende la célula de mamífero de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que la entrada 1 activa la proteína A activadora, la entrada 2 activa la proteína reguladora de respuesta y la salida es el estado de expresión del gen C de salida.

En ciertas realizaciones la entrada 2 activa una segunda proteína A' activadora, que es capaz de activar la segunda proteína B' RR que permite la transcripción de la primera proteína B reguladora de respuesta.

- 10 En ciertas realizaciones, la entrada 1 y la entrada 2 pueden ser señales de entrada de acuerdo con otras realizaciones o estímulos que controlan la expresión de los componentes tal como los factores de transcripción o microARN.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, es proporcionada una puerta lógica biológica OR manipulada. La puerta lógica OR comprende la célula de mamífero de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que la entrada 1 activa dicha proteína A activadora, la entrada 2 activa una segunda proteína A' activadora, que es capaz de activar la misma proteína B RR que la proteína A activadora. La salida de la puerta lógica OR es el estado de expresión de dicho gen C de salida.

- 15 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, es proporcionada una puerta lógica biológica NOR manipulada. Las puertas lógicas comprenden la célula de mamífero de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que la entrada 1 es un inhibidor A- de dicha proteína A activadora, la entrada 2 es un inhibidor B- de dicha proteína B RR y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, es proporcionada una puerta lógica biológica NAND manipulada. Las puertas lógicas comprenden la célula de mamífero de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que la entrada 1 es un inhibidor A- de dicha proteína A activadora, la entrada 2 es un inhibidor A'- de dicha proteína A' activadora y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.

- 25 Un sexto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para integrar una pluralidad de señales de entrada y traducirlas en una señal de salida. Este procedimiento comprende al menos una de las puertas lógicas biológicas manipuladas de acuerdo con los otros aspectos de la invención.

En ciertas realizaciones las señales de entrada son seleccionadas de un agente biológico, un agente químico, un ion de metal, una toxina, y un contaminante.

- 30 En ciertas realizaciones la señal de salida cambia su estado si la pluralidad de señales es específica para una condición ambiental, un contaminante, una sustancia farmacéutica o un profármaco, o un estado patológico.

En ciertas realizaciones el sistema de dos componentes dentro de la célula de mamífero de acuerdo con los aspectos de la invención es un sistema reportero para cambios en el estado interno/externo de la célula. En otras palabras, las proteínas TCS expresadas constitutivamente pueden monitorizar las señales químicas internas de las vías de señalización endógenas y/o de las señales químicas externas.

- 35 En ciertas realizaciones el sistema de dos componentes dentro de la célula de mamífero de acuerdo con los aspectos de la invención es un amplificador de retroalimentación positiva. En otras palabras la activación constitutiva de la vía TCS actúa como amplificador de retroalimentación positiva por control de la salida de la vía con el promotor del gen C de salida, que no reacciona de manera cruzada con los factores de transcripción de la célula de mamífero.

- 40 En ciertas realizaciones el sistema de dos componentes dentro de la célula de mamífero de acuerdo con los aspectos de la invención integra señales de diferentes vías para modificar la célula de mamífero. En otras palabras al integrar señales de diferentes vías o usar las puertas lógicas de acuerdo con los aspectos de la invención estas señales pueden proporcionar una salida de reportero fluorescente o la producción de proteínas para interactuar con las vías de células endógenas; modificando de este modo de la célula en la cual esta vía está activa.

- 45 En ciertas realizaciones las proteínas del sistema de dos componentes dentro de la célula de mamíferos de acuerdo con los aspectos de la invención están constitutivamente activas y son usadas en la sobreexpresión de productos dentro de la célula por el aumento de la expresión como amplificador de la retroalimentación.

En ciertas realizaciones las proteínas del sistema de dos componentes dentro de la célula de mamíferos de acuerdo con los aspectos de la invención están constitutivamente activas y son usadas como material en circuitos genéticos.

- 50 En ciertas realizaciones estos circuitos están controlados con sensores endógenos o con sensores del factor de transcripción, explotando las propiedades consecutivas de las configuraciones TCS proporcionadas en los ejemplos. En ciertas realizaciones la amplificación de los módulos del circuito puede ser lograda con proteínas mutantes constitutivamente activas.

En ciertas realizaciones de todos los aspectos de la invención el gen C de salida podría codificar un reportero

fluorescente, una proteína o microARN que afecta la función celular o el estado interno. Esto puede ser útil en los procesos temporales tal como el desarrollo de fármacos o la expresión diana del fármaco.

En ciertas realizaciones de todos los aspectos de la invención el gen C de salida puede codificar una proteína reportero fluorescente.

- 5 En ciertas realizaciones de la invención, las puertas NOR y NAND pueden ser combinadas para producir cualquier lógica de puerta.

La invención es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos y figuras, de los que pueden ser extraídas realizaciones y ventajas adicionales. Con estos ejemplos se pretende ilustrar la invención pero no limitar su ámbito.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Fig. 1 muestra los esquemas de vías de señalización de dos componentes nativas y trasplantadas. A, la arquitectura de la vía nativa consiste en una proteína receptora, que detecta y propaga una señal a un regulador de respuesta similar que activa la expresión genética. B, la adaptación contemplada al huésped de mamífero ejemplificada con la vía EnvZ-OmpR.

- 15 La Fig. 2 muestra la caracterización básica de las vías de dos componentes trasplantadas. A, requisitos del componente para activación del elemento de respuesta. Cada combinación de componentes es acompañada por imágenes microscópicas representativas con pseudocolor rojo que indica la expresión del marcador de transfección DsRed, y pseudocolor cian que indica la expresión de la salida de la vía AmCyan. Los diagramas de barras muestran el nivel AmCyan en a.u. como media $\pm$ DE de triplicados biológicos independientes. B, relación cruzada de pares HK::RR con elemento de respuesta no similar. C, relación cruzada de HK no similares con pares RR::RE, que indican que DcuS fosforila OmpR. D, observación detallada en la relación cruzada DcuS-OmpR. La interacción DcuS-OmpR es mostrada usando marcadores azules y DcuS-DcuR similar es mostrada con marcadores rojos. Cada momento de medición es el promedio de la medición independiente por duplicado. E, la relación entre las cantidades de HK y RR y la intensidad de una expresión del gen reportero. Para cada gráfico superficial, todas las combinaciones en pares de HK y RR son medidas con HK añadida a 0, 5, 50 y 150 ng por transfección en una placa de 12 pocillos y RR añadida a 0, 10, 30, 100 y 300 ng. Es añadido ADN de relleno para mantener constante la cantidad de ADN total. Todos los puntos de referencia son promedios por duplicado.

- 20 La Fig. 3 muestra control complejo de la expresión genética con las vías TCS usando genes HK y RR controlados con antibióticos. Los esquemas de circuito se muestran a la izquierda y los datos cuantitativos para las vías NarXL y DcuSR están sobre la derecha. Las proteínas PIT2 y ET accionadas por CMV activan HK y RR a través de los promotores de pPIR y pETR, respectivamente. La concentración final de PI y ET es de 10 mg/ml y 4mg/ml, respectivamente. Los datos resultantes son presentados como media $\pm$ DE de los triplicados biológicos. Las imágenes microscópicas son mostradas con pseudocolor rojo que indica la expresión del marcador de transfección DsRed, y pseudocolor cian que indica la expresión de la salida de la vía AmCyan.

- 25 La Fig. 4 muestra el uso de las vías de TCS y los componentes individuales para la expresión genética de mamíferos. A, expresión genética controlada por la configuración de la puerta OR. Parte superior, representación esquemática de una puerta OR usando la presencia de NarX y NarQ como entradas. Parte inferior, cuantificación de la puerta mostrada como media $\pm$ DE de los triplicados biológicos con imágenes microscópicas representativas. Las imágenes son mostradas con pseudocolor rojo que indica la expresión del marcador de transfección DsRed (panel superior), y pseudocolor cian que indica la expresión de la salida de la vía AmCyan (panel inferior). B, actividad de diversos componentes de TCS mutantes. Los genes TCS de longitud completa, truncados y mutantes están representados con cada dominio de proteína codificado por color y marcado. Los datos experimentales son mostrados a la derecha. Cada barra representa media $\pm$ DE de un triplicado biológico. Los valores de salida para NarX + NarL y NarL son tomados del experimento en el panel A; sus resultados nuevamente son mostrados en el panel B simplemente para comparación lado a lado.

La Fig. 5 muestra ejemplos de vías de señalización de dos componentes en bacterias.

Ejemplos

- La manipulación de la vía de señalización es una vía hacia los circuitos biológicos sintéticos. Ha sido enseñado que los fosforelays de histidina-aspartato han evolucionado en procariotas en los que forman la base para la señalización de dos componentes. Los fosforelays de tirosina-serina/treonina, ejemplificados por las cascadas de quinasa MAP, son predominantes en eucariotas. El recableado racional de estas familias de vías es conocido en la técnica. Un ejemplo conocido en la técnica es la implementación de una vía procariótica de dos componentes en una especie de planta para detectar TNT ambiental. En esta invención, los inventores de la presente desvelan el "trasplante" de las vías de dos componentes en células de mamífero para proporcionar un kit de herramientas ortogonal y diverso para

una variedad de tareas de procesamiento de señales. Los inventores de la presente usan las vías de dos componentes en el cultivo de células de mamífero y las usan para el control programable de la expresión genética. Por consiguiente, las secuencias de codificación de los componentes de histidina quinasa (HK) y regulador de respuesta (RR) tienen codones optimizados para las células humanas, mientras que los RR son fusionados con un dominio de transactivación. Los promotores de respuesta son abastecidos al fusionar los sitios de unión al ADN delante de un promotor mínimo. Los inventores desvelan ejemplos de que la coexpresión de HK y sus RR similares en células de mamífero cultivadas son suficientes para inducir la expresión genética en ausencia de desencadenantes químicos de las vías. Los mutantes que eran constitutivos en el marco nativo demostraron un comportamiento similar en células de mamífero. Los inventores de la presente usan, además, las vías de TCS para implementar la regulación genética lógica AND, NOR y OR de dos entradas usando promotores inducibles para accionar las HK y los RR. De este modo, los sistemas de dos componentes pueden ser aplicados en diferentes capacidades en las células de mamífero y sus componentes pueden ser usados para circuitos genéticos sintéticos a gran escala.

TCS es parcialmente funcional en células de mamíferos

El trasplante de las vías de TCS procarióticas a las líneas celulares de mamífero requiere una cantidad de adaptaciones necesarias (Fig. 1B). Cada gen que codifica una proteína TCS tiene codones optimizados para conferir al uso de codones humanos; además, son colocados bajo promotor inicial CMV inmediato constitutivo. La secuencia básica de aminoácidos de cada HK y RR es conservada, mientras que las secuencias de RR son aumentadas con 3 x dominios de transactivación VP16 mínimos en el extremo terminal C. (Cabe destacar que la señal de localización nuclear no está fusionada a RR). Finalmente, el promotor de respuesta que conduce un AmCyan reportero fluorescente es creado fusionando los sitios de unión al ADN de diferentes RR delante de un promotor mínimo de mamífero.

Tres vías de TCS de E. Coli son seleccionadas y adaptadas a las células de mamíferos, incluyendo EnvZ-OmpR, NarXL y DcuSR. El diseño de HK y RR adaptados es realizado como es descrito anteriormente, mientras que el diseño de los promotores sensibles varía de un caso a otro. Para el elemento de respuesta a OmpR (OmpR-RE), es usada una secuencia de consenso ATTTACATTTTGAAACATCTA (SEC ID NÚM. 01). Dos copias de esta secuencia son separadas por el separador de 10 pb e insertadas 18 pb corriente arriba de la caja TATA en el promotor mínimo central. Para el elemento de respuesta a NarL (NarL-RE), es usada una secuencia de consenso TACCCCTATAGGGGTA (SEC ID NÚM. 02); dos copias separadas por 10 pb fueron usadas idénticamente a Om-pR-RE anterior. Finalmente, para el promotor DcuRsensible, el elemento de respuesta a DcuR es construido usando una secuencia de repetición individual TGATTAACCTTTAAAAAGTGCTG (SEC ID NÚM. 03) identificada en la región promotora del gen dclA. Los promotores regulados antes mencionados son clonados corriente arriba de la proteína fluorescente AmCyan.

En primer lugar, los inventores de la presente indagaron si la coexpresión de los genes de la vía en células humanas cultivadas resulta en activación genética. Han sido realizadas transfecciones transitorias en células HEK293 con (i) ninguno de los casetes de expresión de TCS; (ii) casetes HK o RR solos y (iii) ambos HK y RR. Las tres vías generan fuerte expresión del gen reportero cuando ambos HK y RR están presentes pero no cuando cualquiera de los componentes falta (Fig. 2A). La inducción con DcuSR fue más débil, quizás debido a tener un sitio de unión a ADN individual en lugar de doble en el promotor. Estos resultados indican que los atributos principales de las vías, tal como el pliegue de la proteína, el fosforelay y la unión diferencial al ADN y la transactivación, son operativos en células humanas. Al mismo tiempo, ocurre inducción genética en ausencia de estímulo externo similar. Mientras que las vías de EnvZ-OmpR y NarXL responden a entradas que están presentes en el medio, DcuSR es sensible al fumarato. Ha sido realizada titulación de fumarato y no ha sido hallada evidencia clara para inducción de la vía dado que la mayoría de la actividad ya estaba presente en el fumarato cero. Los niveles intermedios de fumarato parecen aumentar la entrada modestamente, pero incluso niveles más altos fueron inhibidores. Además, los RR no parecen estar fosforilados por las quinasas nativas de las células HEK293, como es evidenciado por el bajo nivel de expresión de salida en presencia de RR solo.

Ortogonalidad y relación cruzada de TCS en células humanas

TCS múltiples operan sin relación cruzada en su entorno endógeno. Su capacidad de operar múltiples vías en paralelo permite la fácil mejora de los circuitos genéticos. En primer lugar, los pares canónicos HK::RR son mantenidos en conjunto pero los elementos de respuesta son variados (Fig. 2B). La activación es altamente específica para el promotor sensible correcto. En el segundo experimento, los RR son combinados con su promotor sensible similar y la HK corriente arriba es variada. En un caso los inventores de la presente observan que una DcuS de HK activa la OmpR de RR no similar mientras que en todos los casos el fosforelay es específico (Fig. 2C). La respuesta a la dosis de la actividad de DcuS similar, así como no similar, fue investigada de manera adicional (Fig. 2D). El resultado muestra un comportamiento marcadamente distinto entre los dos casos. La vía armada de manera correcta exhibe respuesta aguda a la dosis que disminuye tras aumentar de manera adicional en DcuS. Al mismo tiempo, la reactividad cruzada muestra un aumento monótono y lento. Ciertamente, la operación en el nivel óptimo de DcuS humanizado genera una alta selectividad hacia la vía similar.

Después, la relación entrada-salida de las vías trasplantadas es asignada. Por consiguiente, la cantidad de plásmido de respuesta es fijada y las cantidades de ambos plásmidos que codifican HK y RR son variadas (Fig. 2E). Todas las vías muestran sensibilidad marcada a la cantidad de HK, lo que no es sorprendente dada su naturaleza enzimática.

La dependencia sobre la cantidad de RR es gradual; sin embargo, la mitad de la inducción máxima es alcanzada con cantidades muy bajas de ambos HK y RR con relación al gen de respuesta. El mapa de entrada-salida de la vía de DcuSR reproduce el comportamiento no monótono observado en la Fig. 2D. El posible motivo para este comportamiento es que la forma desfosforilada de DcuS actúa como fosfatasa para DcuR-P, similar a otras quinasas de histidina.

TCS como bloques de construcción para circuitos lógicos genéticos

Los experimentos anteriores muestran que la respuesta requiere expresión de ambos componentes de la vía. Dicho modo de operación frecuentemente es descrito como una lógica AND siendo las entradas en este caso la expresión de HK y RR respectivamente. El control de estos genes con estímulos externos genera comportamientos lógicos adicionales. Para ejemplificar esta posibilidad, los inventores de la presente clonaron los componentes de las vías NarXL y DcuSR en vectores controlados por los transactivadores diseñados PIT2 (Fussenegger *et al.*, Nat Biotech 200, 18(11), 1203-1208) y ET (Weber *et al.*, Nat Biotech, 20(9), 901-907). Esto ha permitido que los antibióticos eritromicina (ET) y pristinamicina 1A (PI) controlen la salida del circuito. Dado que los cofactores son inhibidores de la unión al ADN de sus transactivadores similares, la lógica AND subyacente es traducida en lógica NOR cuando los antibióticos comprenden las entradas externas (Fig. 3). El comportamiento lógico resultante es consistente con la expectativa (salida más alta en ausencia de ambas entradas, baja salida de otro modo). La vía NarXL muestra el intervalo dinámico más grande, mientras que con la vía DcuSR la fuga en uno de los estados OFF es probable debido a la muy alta sensibilidad de esta vía a cantidades diminutas de DcuS HK y la expresión residual de DcuS en presencia de PI. El bajo nivel de inducción en el estado ON es debido a la múltiple cotransfección de plásmidos.

Además de las vías lineales que permiten las puertas AND en células humanas, la relación cruzada de TCS proporciona tipos adicionales de control lógico. Por ejemplo, NarQ de HK es capaz de activar NarL casi de manera tan eficiente como NarX. Por lo tanto, una vía en la que NarL humanizado es controlado por ambos NarX y NarQ es construida y la respuesta medida como función de la presencia de NarX y NarQ (Fig. 4A). Por cierto, es observado un comportamiento OR casi perfecto. Los resultados indican que la lógica compleja es posible con vías que interactúan naturalmente.

Los comportamientos mutantes conocidos son recapitulados en el huésped de mamífero

La investigación sobre TCS ha revelado un gran número de mutantes que poseen ciertas cualidades que pueden ser de utilidad en las vías sintéticas. Por ejemplo, es sabido que los dominios citoplasmáticos de HK resultan en la señalización constitutiva. Un dominio citoplasmático de EnvZ (EnvZ cyt) es construido y ha sido descubierto que soporta la transducción de señal constitutiva a través de OmpR. Un mutante D55E OmpR de RR es conocido por ser un activador constitutivo en las bacterias, y su versión humanizada funciona también como activador constitutivo. Del mismo modo, el dominio C terminal de NarL (NarLc) es constitutivo en las bacterias y continúa como un inductor muy fuerte de NarL-RE en células de mamífero. Esto sugiere que los hallazgos realizados en el entorno procariótico nativo son traducidos en el sistema humanizado, y que las vías humanizadas operan a lo largo de los mismos principios mecánicos con que lo hacen en los procariotas. También ilustran que los genes que codifican TCS y sus variantes pueden ser usados como una extensa fuente de "partes biológicas" para circuitos genéticos de mamíferos.

Discusión

El fosforelay de histidina-aspartato está ausente de células de vertebrados mientras que es hallado en plantas, levadura, eucariotas inferiores y mucho más comúnmente en procariotas. La falta de genes homólogos en vertebrados sugiere las vías de TCS procarióticas como módulos de procesamiento de señal ortogonal en células de mamífero para diseño de circuitos. Sin embargo, la conservación de los procesos bioquímicos básicos durante el "trasplante" en mamíferos no es garantizado por ningún medio, ya que requiere tres condiciones. En primer lugar, la operación interna de una vía debe ser conservada tanto como sea posible. En segundo lugar, los componentes de la vía no deben afectar el huésped de manera no específica. En tercer lugar, el huésped no debe interferir con los componentes de la vía.

Los inventores de la presente desvelan en la presente memoria que los fosforelays entre HK y RR, y la unión al ADN diferencial por el RR seguido de inducción genética, ocurren en células de mamíferos. La presencia de un ligando similar no aparenta ser necesaria aunque modestamente module la actividad de la vía, al menos en el caso de DcuSR. Sin embargo, el hecho de que los genes HK de longitud completa sean funcionales sugiere que son plegados adecuadamente y asociados con una membrana. Con respecto al efecto de la vía sobre células huésped, no son observados efectos adversos importantes. Las secuencias unidas al ADN de los diferentes RR son extensas y no se espera que ocurran con frecuencia en el genoma humano. Finalmente, los elementos de respuesta son silenciosos en células HEK293 por su cuenta, lo que significa que ningún activador endógeno es unido a estos sitios. Los RR en combinación con RE generan solo baja expresión de fondo, probablemente debido a la unión al ADN residual de los RR no fosforilados en lugar de debido a la transferencia de fosforilo a RR por las quinasas endógenas.

Entre sí mismas, las vías exhibieron una notable carencia de reactividad cruzada. Una interacción inesperada fue descubierta entre DcuS y OmpR. Este ensayo de relación cruzada presenta un enfoque para estudiar la bioquímica de TCS *in vivo* en el fondo limpio desprovisto de interferencia. Incluso en ausencia de respuesta a los ligandos

5 externos, TCS puede soportar integración de señal lógica compleja en células de mamífero. Los ejemplos de puertas AND, NOR y OR que usan HK y RR inducibles y constitutivos son desvelados en la presente invención. Dada la dificultad de implementar la activación genética como AND en células de mamífero, las vías de TCS adaptadas son una nueva fuente atractiva de dichos elementos de control. Además, los mutantes constitutivos actúan consistentemente con su comportamiento en procariotas; estos mutantes pueden ser una fuente rica de bloques de construcción simple y mutuamente ortogonal en circuitos genéticos extensos.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de mamífero que comprende al menos una vía de señalización procariótica de dos componentes (TCS) comprendida por:
 - i. una proteína activadora A, en la que dicha proteína activadora A es un sensor histidina quinasa que comprende un residuo de histidina,
 - ii. una proteína B reguladora de respuesta (RR) activada por dicha proteína A, derivando tal activación en una proteína B RR activada, en la que dicha proteína B RR es un regulador transcripcional que comprende un residuo de ácido aspártico, y en la que la activación de dicha proteína B RR por dicha proteína activadora A es llevada a cabo por la transferencia de un fosfato de dicho residuo de histidina a dicho residuo de ácido aspártico, y
 - iii. un gen C de salida ligado operativamente a un promotor,

en la que la transcripción del aparato de transcripción en dicha célula de mamífero de dicho promotor está activada por la proteína B RR activada, y la expresión del gen C de salida define al menos un primer estado 0, sin transcripción, y un segundo estado 1, de transcripción detectable.
2. La célula de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína A activadora y dicha proteína B RR son seleccionadas de EnvZ-OmpR, NarX-NarL, DcuS-DcuR y los pares de proteínas activadoras y proteínas reguladoras de respuesta especificadas en la Fig. 5.
3. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína A y dicha proteína B RR tienen codones optimizados para células humanas.
4. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el gen C de salida codifica un reportero fluorescente, una proteína o microARN que afecta la función celular o el estado interno.
5. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína A activadora puede estar constitutivamente activa o ser activada por señales de entrada.
6. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las señales de entrada son seleccionadas de: quinonas, nitrato, nitrito, citrato, isocitrato, fumarato, succinato, malato, indol, serina, aspartato, quimioatrayentes, oxígeno, monóxido de carbono, óxido nítrico, luz azul, vancomicina, potasio, moléculas de detección de quórum, cambio de temperatura, iones de sulfato, ácido nicotínico, cambios en la osmolaridad, tolueno, O-xileno, glutamina, 2-cetoglutarato, magnesio.
7. Una puerta lógica biológica ADN manipulada que comprende la célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la entrada 1 activa dicha proteína A activadora, la entrada 2 activa dicha proteína B reguladora de respuesta y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.
8. La puerta lógica biológica ADN manipulada de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la entrada 2 activa una segunda proteína A' activadora, que es capaz de activar la segunda proteína B' RR que permite la transcripción de la primera proteína B reguladora de respuesta.
9. La puerta lógica biológica ADN manipulada de acuerdo con la reivindicación 7 y 8, en la que la entrada 1 y la entrada 2 pueden ser estímulos de acuerdo con la reivindicación 6 o estímulos que controlan la expresión de los componentes seleccionados de los factores de transcripción o microARN.
10. Una puerta lógica biológica OR manipulada que comprende la célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que la entrada 1 activa dicha proteína A activadora, la entrada 2 activa una segunda proteína A' activadora capaz de activar la misma proteína B RR que la proteína A activadora y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.
11. Una puerta lógica biológica NOR manipulada que comprende la célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que la entrada 1 es un inhibidor A- de dicha proteína A activadora, la entrada 2 es un inhibidor B- de dicha proteína B RR y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.
12. Una puerta lógica biológica NAND manipulada que comprende la célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que la entrada 1 es un inhibidor A- de dicha proteína A activadora, la entrada 2 es un inhibidor A'- de dicha proteína A' activadora y la salida es el estado de expresión de dicho gen C de salida.
13. Un procedimiento in vitro para integrar una pluralidad de señales de entrada y traducirlas en una señal de salida que comprende al menos una de las puertas lógicas biológicas manipuladas de acuerdo con las reivindicaciones 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha señal de salida cambia su estado si dicha pluralidad de señales es específica para:

- i. una condición ambiental,
- ii. un contaminante,
- iii. una sustancia farmacéutica o profármaco, y
- iv. un estado patológico.

5

Fig. 1

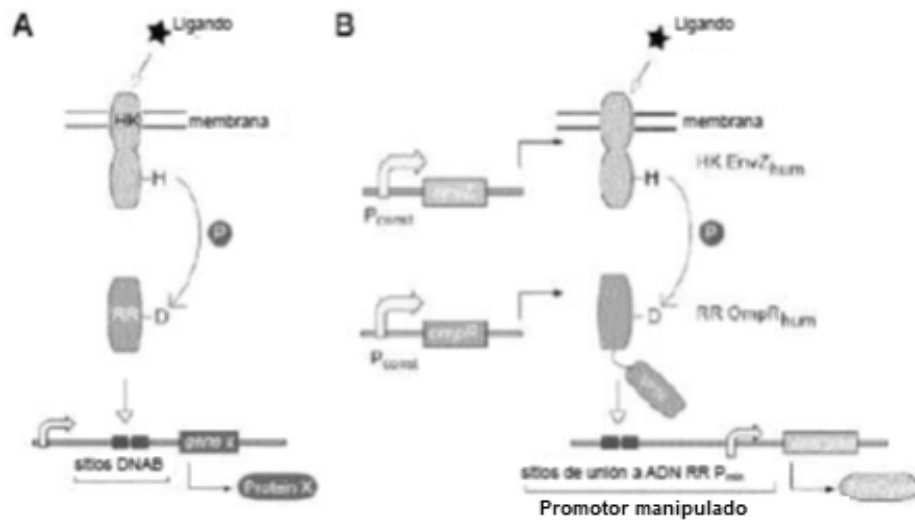


Fig. 2

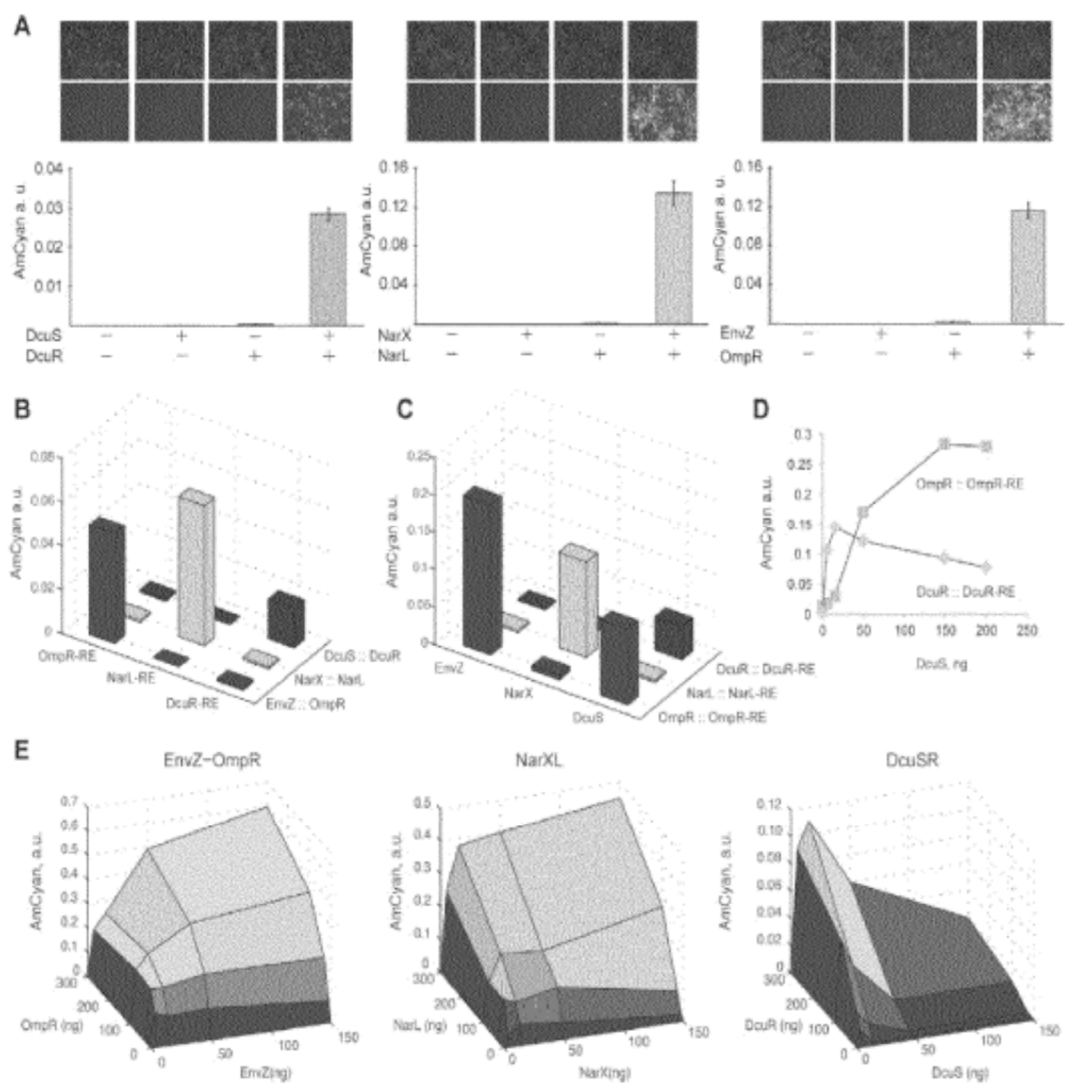


Fig. 3

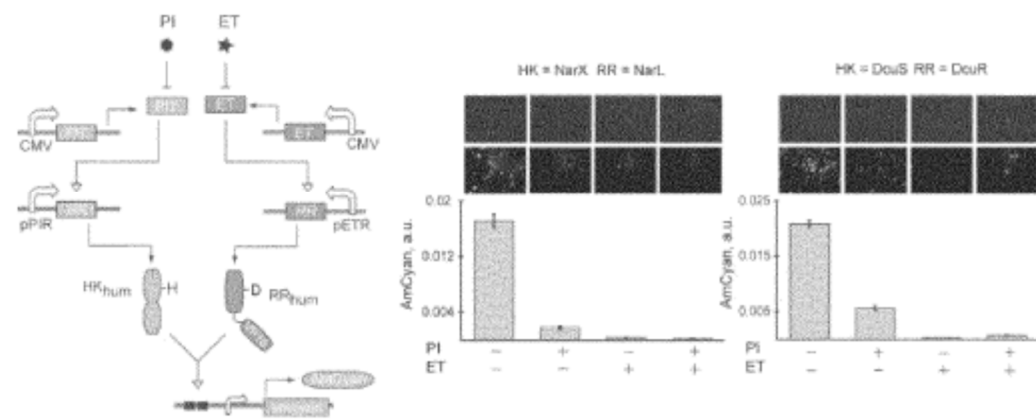


Fig. 4

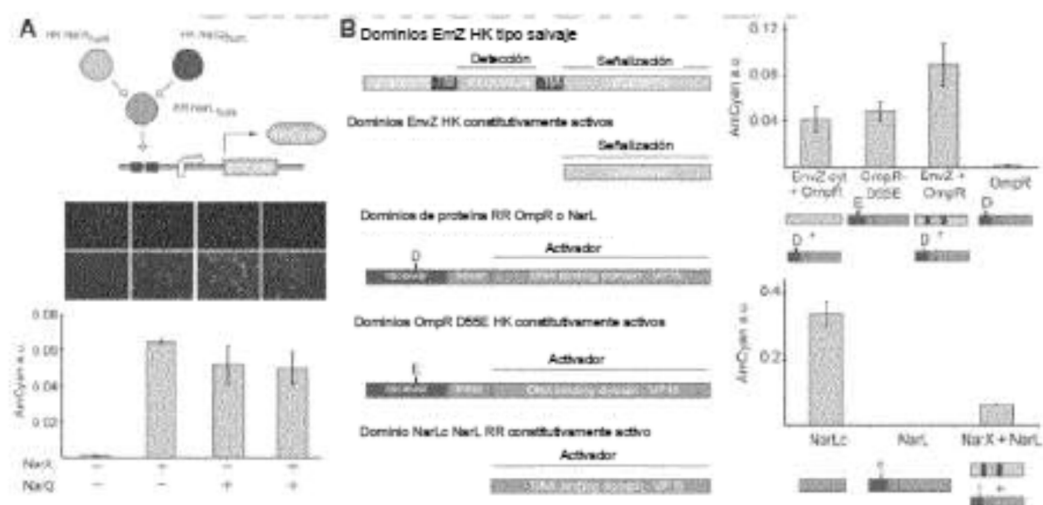


Fig. 5



Entrada	VIA: map02020
Nombre	Sistema de dos componentes
Descripción	Los sistemas de transducción de señal de dos componentes permiten que las bacterias detecten, respondan y se adapten a cambios en su entorno y en su estado intracelular. Cada sistema de dos componentes consiste en un sensor de proteína histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR). En la vía de dos componentes prototípica, el sensor HK fosforila su propio residuo His conservado en respuesta a señales en su entorno. Después, el grupo fosforilo de HK es transferido a un residuo Asp específico en el RR. El RR activado luego puede efectuar cambios en la fisiología celular, a menudo por regulación de la expresión génica. Las vías de dos componentes de este modo a menudo permiten que las células detecten y respondan a los estímulos por inducción de cambios en la transcripción.
Clase	Procesamiento de información ambiental; transducción de señal BRITE hierarchy
Módulo	M00314 Sistema de transporte de bacitracina [PATH: map02010] M00315 Sistema de transporte de ABC sin caracterizar [PATH: map02020] M00316 Sistema de transporte de manganeso [PATH: map02010] M00434 M00434 PhoR-PhoB (respuesta de privación de fósforo) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00443 SenX3-RegX3 (respuesta de privación de fósforo) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00444 PhoQ-PhoP (transporte de magnesio) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00445 EnvZ-OmpR (respuesta al estrés osmótico) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00446 RstB-RstA sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00447 CpxA-CpxR (respuesta al estrés de envoltura) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00448 CusS-CusR (respuesta al estrés de secreción) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00449 CreC-CreB (regulación de fósforo) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00450 BaeS-BaeR (respuesta al estrés de envoltura) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00451 BasS-BasR (resistencia a péptidos antimicrobianos) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00452 CusS-CusR (tolerancia al cobre) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00453 QseC-QseB (detección de quórum) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00454 KdpD-KdpE (transporte de potasio) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00455 TorS-TorR (respiración de N-óxido de trimetilamina) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00456 ArcB-ArcA (control de redox anóxico) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00457 TctE-TctD (transporte de ácido tricarbónico) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020] M00458 ResE-ResD (respiración aeróbica y anaeróbica) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]

Figura 5 continuación

M00459	VicK-VicR (metabolismo de la pared celular) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00460	MprB-MprA (mantenimiento de infección persistente) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00461	MtrB-MtrA (respuesta al estrés osmótico) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00462	PrrB-PrrA (multiplicación intracelular) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00463	TrcS-TrcR sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00464	NrsS-NrsR (tolerancia al níquel) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00465	ManS-ManR (homeostasis de manganeso) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00466	NblS-NblR (fotosíntesis) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00467	SaaA-RpaAB (mediación de los ritmos circadianos) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00468	SaeS-SaeR (regulación de la virulencia por estafilococo) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00469	BceS-BceR (transporte de bacitracina) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00470	YxdK-YxdJ (respuesta a los péptidos antimicrobianos) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00471	NarX-NarL (respiración de nitrato) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00472	NarQ-NarP (respiración de nitrato) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00473	UhpB-UhpA (captación de fosfatos de hexosa) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00474	RcsC-RcsD-RcsB (síntesis de capsula) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00475	BarA-UvrY (metabolismo de carbono central) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00476	ComP-ComA (competencia) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00477	EvgS-EvgA (tolerancia a ácidos y fármacos) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00478	DegS-DegU (control del comportamiento multicelular) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00479	DesK-DesR (regulación de fluidez de lípidos de la membrana) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00480	VraS-VraR (síntesis de peptidoglicano de la pared celular) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00481	LiaS-LiaR (respuesta al estrés de la pared celular) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00482	DevS-DevR (respuesta redox) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00483	NreB-NreC (reducción de nitrato/nitrato no asimilatorio) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00484	YdhH-YdhI sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00485	KinABCDE-Spo0FA (control de esporulación) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00486	CitA-CitB (fermentación de citrato) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]
M00487	CitS-CitT (transporte de magnesio-citrato) sistema regulador de dos componentes [PATH: map02020]

Figura 5 continuación

M00488	DcuS-DcuR (metabolismo de dicarboxilato C4 aeróbico) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00489	DctS-DctR (transporte de dicarboxilato C4) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00490	MalK-MalR (transporte de malato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00491	Sistema de transporte de oligómeros de arabinogalactano putativo [PATH: map02010]
M00492	LytS-LytR (metabolismo y autólisis de la pared celular) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00493	AlgZ-AlgR (producción de alginato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00494	NatK-NatR (extrusión de sodio) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00495	AgrC-AgrA (síntesis de exoproteína) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00496	ComD-ComE (competencia) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00497	GlnL-GlnG (regulación de nitrógeno) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00498	NtrY-NtrX (regulación de nitrógeno) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00499	HydH-HydG (tolerancia al metal) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00500	AtoS-AtoC (biosíntesis complejada de poli-(R)-3-hidroxibutirato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00501	PilS-PilR (síntesis de fimbriae tipo 4) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00502	GlrK-GlrR (metabolismo de azúcar amino) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00503	PgtB-PgtA (transporte de fosfoglicarato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00504	DctB-DctD (transporte de dicarboxilato C4) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00505	KinB-AlgB (producción de alginato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00506	CheA-CheYBV (quimiotaxis) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00507	ChpA-ChpB/PilGH (quimiosensor) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00508	PixL-PixGH (fototaxis positiva) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00509	WspE-WspRF (quimiosensor) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00510	Cph1-Rcp1 (respuesta a la luz) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00511	PleC-PleD (control del destino celular) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020 map04112]
M00512	CckA-CtrA/CpdR (control del ciclo celular) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020 map04112]
M00513	LuxQN/CqsS-LuxU-LuxO (detección de quórum) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020 map05111]
M00514	TtrS-TtrR (respiración de tetraciónato) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]
M00515	FliB-FliC (síntesis flagelar polar) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020 map05111]
M00516	SLN1-YPD1-SSK1/SKN7 (osmódetección) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020 map04011]
M00517	RpfC-RpfG (señalización de célula a célula) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: map02020]

Figura 5 continuación

<u>M00518</u>	GlnK-GlnL (utilización de glutamina) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00519</u>	YeaM-YeaN sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00520</u>	ChvG-ChvI (sensor de acidez) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00521</u>	CiaH-CiaR (resistencia al estrés y patógenos) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00522</u>	SalK-SalR sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00523</u>	RegB-RegA (respuesta redox) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]
<u>M00524</u>	FixL-FixJ (Ejación de nitrógeno) sistema regulatorio de dos componentes [PATH: <u>map02020</u>]

Obtenido de: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway:map02020