(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 996**

(21) Número de solicitud: 200603279

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01) ***C12N 15/65*** (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) ***C12N 1/20*** (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **27.12.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2009**

Fecha de la concesión: **18.05.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **31.05.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **31.05.2010**

(73) Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid**
Einstein, 3
28049 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Berenguer Carlos, José;**
Cava Valenciano, Felipe y
Blas Galindo, Emilio

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

(54) Título: **Nuevo marcador de selección termoestable para la manipulación genética de *Thermus* spp.**

(57) Resumen:
Nuevo marcador de selección termoestable para la manipulación genética de *Thermus* spp.
La invención describe un nuevo marcador de selección termoestable para la manipulación genética de bacterias del género *Thermus* spp., en particular, con un polinucleótido que, cuando se expresa, la proteína resultante proporciona a las bacterias del género *Thermus* spp. un fenotipo dependiente de estreptomicina, lo que tiene distintas aplicaciones en el campo de la biotecnología como marcador de selección de clonaje y expresión de genes de interés o en la deleción específica de genes.

ES 2 323 996 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Nuevo marcador de selección termoestable para la manipulación genética de *Thermus* spp.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con marcadores de selección termoestable para la manipulación genética de bacterias del género *Thermus* spp., en particular, con un polinucleótido que, cuando se expresa, la proteína resultante proporciona a las bacterias del género *Thermus* spp. un fenotipo dependiente de estreptomicina, lo que tiene distintas aplicaciones en el campo de la biotecnología como marcador de selección de clonaje y expresión de genes de interés o en la deleción específica de genes.

Antecedentes de la invención

La producción de proteínas de interés biotecnológico a escala industrial suele llevarse a cabo mediante el clonado del gen que codifica dicha proteína en bacterias o levaduras modelos fácilmente manipulables (e.g., *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*). Sin embargo, cuando se trata de proteínas procedentes de bacterias termófilas, como las procedentes del género *Thermus* spp., que poseen una complejidad en su estructura muy particular, dichos sistemas modelo no son eficaces, lo que hace necesario emplear al propio organismo termófilo del que procede la proteína como factoría celular. Lamentablemente, las estrategias empleadas actualmente para la expresión de proteínas de interés en organismos termófilos (e.g. *Thermus* spp.), dependen exclusivamente de vectores que confieren resistencia a kanamicina lo que impide la producción de proteínas en cepas que posean dicha resistencia de forma natural.

Las bacterias del género *Thermus* spp. se caracterizan por su capacidad para crecer a altas temperaturas y por su facilidad de manipulación genética, única entre organismos termófilos extremos. Por otro lado, constituyen una fuente enormemente amplia de enzimas termoestables, tanto de aplicación industrial, tal como lipasas, catalanas, pululasas y proteasas, como de aplicación en técnicas de biología molecular, como las ADN polimerasas.

La producción de enzimas de interés biotecnológico procedentes de microorganismos termófilos extremos, suele efectuarse mediante su clonado y expresión a alto nivel en una bacteria o levadura modelo fácilmente manipulable, tal como *E. coli* o *S. cerevisiae*. Sin embargo, existen una gran cantidad de enzimas termófilas cuya complejidad de síntesis hace imposible su obtención en forma activa en estos organismos modelo (Hidalgo, A. y cols., 2004. *Thermus thermophilus* as a cell factory for the production of a thermophilic Mn-dependent catalase which fails to be synthesized in an active form in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 70 (7): 3839-3844). Este es el caso frecuente de enzimas hetero-oligoméricas o el de aquellas enzimas que requieren la incorporación de un cofactor en el proceso de síntesis, que suele requerir la ayuda de chaperonas específicas que mantienen la estructura de la enzima en posición abierta para la entrada del mencionado cofactor. En tales casos, que pueden llegar a constituir hasta el 50% de las enzimas codificadas en cualquier termófilo, la alternativa evidente es la de utilizar en la producción un microorganismo termófilo relacionado evolutivamente con aquel del que procede la enzima de interés.

Actualmente, existen vectores o plásmidos seleccionables para el clonaje y la expresión de enzimas en cepas del género *Thermus* spp. Tales plásmidos se basan en los siguientes sistemas de selección:

a) *Gen termoestable de resistencia a kanamicina*

(Liao, H. y cols., 1986. Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 83: 576-580). A partir de este gen, se han desarrollado una serie de vectores para *Thermus* spp., descritos esencialmente en los siguientes artículos:

- Lasa y cols., 1992. Development of *Thermus thermophilus*. *Escherichia* shuttle vectors and their use for the expression of the *Clostridium thermocellum* celA gene in *Thermus thermophilus*. Journal of Bacteriology. Vol. 174:6424-6431. En este artículo se describe la autoselección de orígenes de replicación crípticos de cepas de *Thermus* spp. mediante la incorporación del gen quimérico de resistencia termoestable a kanamicina, desarrollado en el artículo publicado por el mismo grupo en la revista Molecular Microbiology. Vol. 6:1555-1564 (1992) titulado "Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus*", y descrito en la patente española número P9301522.

- Mather y Fee. 1992. Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: Expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyl transferase gene. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 58:421-425. Los autores emplean el gen de resistencia termoestable a kanamicina descrito por Liao y colaboradores en 1986 (citado *supra*) para generar por inserción al azar un plásmido con el origen del replicación de pTT8.

- De Grado y cols., 1999. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. Plasmid. Vol. 42:241-245. Los autores describen un vector derivado del publicado por Lasa y cols. en 1992 (citado *at supra*) en el que se ha definido y recortado el origen de replicación mínimo necesario para su mantenimiento en *Thermus* spp., y se ha integrado en el vector pUC18 junto con el gen quimérico que confiere resistencia termoestable a kanamicina (P9301522). Este vector ha sido empleado en trabajos posteriores para la expresión de proteínas y de ARN.

- Moreno y cols., 2003. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. Plasmid. Vol: 49:2-8. En este artículo se describe el desarrollo de un vector derivado del descrito en de Grado y cols (1999) (citado *at supra*) al que se le incorporó un promotor inducible en cepas capaces de respirar nitrato, mostrándose su actividad con dos genes testigo.

b) *Otras resistencias termoestables a antibióticos*

- Brouns y cols., 2005. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. Journal of Biological Chemistry. Vol. 280:11422-11431. Los autores describen en dicho artículo un nuevo sistema de selección para *Thermus thermophilus* basado en una forma termoestable de una proteína de resistencia al antibiótico bleomicina, donada en un vector derivado del de de Grado y cols. 1999 (citado *at supra*).

- Nakamura y cols., 2005. *In vivo* directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. J Biosci Bioeng. Vol. 100:158-63. En este trabajo se desarrolla por evolución dirigida una versión termoestable de la proteína de resistencia a hygromicina de *E. coli*, capaz de conferir resistencia a este antibiótico en *Thermus thermophilus* hasta 67ºC, y lo emplean para el desarrollo de nuevos vectores replicativos.

c) *Genes capaces de complementar auxotrofias en mutantes específicos*

- Koyama y cols., 1990. A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. FEMS Microbiology Letters. Vol. 72:97-102. En este artículo los autores combinan un plásmido críptico con los genes trpBA, seleccionable en una cepa auxotrófica para triptófano, aunque presenta una alta frecuencia de recombinación con el cromosoma.

- Kayser y Kilbane., 2001. New host-vector system for *Thermus* spp. based on the malate dehydrogenase gene. Journal of Bacteriology. Vol. 183:1792-5. En este artículo se propone la utilización del gen de la enzima malato deshidrogenasa como sistema de selección de plásmidos en cepas defectivas en esta enzima. Este trabajo se continuó con la publicación por Kayser y cols. (2001) del artículo titulado "inducible and constitutive expression using new plasmid and integrative expression vectors for *Thermus* spp" en Lett Appl Microbiol. Vol. 32:412-8, en el que se muestra el empleo de este sistema de selección para el desarrollo de vectores con una cierta capacidad de expresión en *Thermus* spp. Más recientemente, los mismos autores han extendido el número de enzimas expresables en *Thermus* spp. en el artículo de Park y cols. de 2004 titulado "Heterologous gene expression in *Thermus thermophilus*: beta-galactosidase, dibenzothiophene monooxygenase, PNB carboxy esterase, 2-aminobiphenyl-2,3-diol dioxygenase, and chloramphenicol acetyl transferase". J Ind Microbiol Biotechnol. Vol. 31:189-97.

- Tamakoshi y cols., 1997. A new *Thermus-Escherichia coli* shuttle integration vector system. J. Bacteriol. Vol. 179:4811-4814. En este artículo se emplean dos sistemas de selección basados en los genes leuB y pyrE que complementan mutantes de *Thermus thermophilus* defectivos en la síntesis de Leucina y de Uracilo, respectivamente. Resulta interesante destacar que el gen pyrE silvestre puede ser contraseleccionado en presencia de ácido fluoro-orótico, una propiedad que aprovecha el mismo grupo de investigación para desarrollar en su artículo Tamakoshi y cols. de 1999 titulado "An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*" y publicado en FEMS Microbiol Lett. Vol. 173:431-437, una metodología de deleción dirigida de genes.

Adicionalmente a la producción de enzimas de interés, las bacterias del género *Thermus spp*. tienen gran potencial de utilización como sistemas de obtención de enzimas termoestables mediante selección funcional a elevadas temperaturas, existiendo algunos ejemplos de ello en la literatura científica (Fridjonsson y cols., 2002. Thermoadaptation of alpha-galactosidase AgaB1 in *Thermus thermophilus*. J Bacteriol. Vol. 184:3385-3391; Brouns y cols., 2005. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. J Biol Chem. Vol. 280:11422-31) y en los archivos de patentes (US 5,786,174 y la patente española número P9301522). No obstante, la aplicación de estos métodos depende de la generación de una cepa de *Thermus* spp. mutante que requiera de la actividad funcional de la enzima a termoestabilizar para su crecimiento, siendo muy limitadas en la actualidad las metodologías existentes para la obtención de dichos mutantes debido a que su aislamineto pasa bien por utilizar el gen de resistencia termoestable a kanamicina, limitando la utilización posterior de vectores, o alternativamente, empleando una metodología de selección positiva y negativa de la presencia del gen pyrE según se describe en (Tamakoshi y cols., 1999. An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. FEMS Microbiol. Lett. Vol. 173:431-437), que resulta mucho más compleja y laboriosa, y no siempre efectiva por la elevada presencia de falsos positivos en varios de los procesos de selección.

No hay precedentes en la literatura científica de la utilización de genes de dependencia a estreptomicina para la generación de plásmidos de clonaje y/o expresión para *Thermus* spp. ni para la obtención dirigida de mutantes de deleción mediante selección negativa directa. Lo más parecido que existe actualmente para generar mutantes de deleción es el anteriormente comentado de utilización de procesos de selección negativa de mutantes pyrE con el antimetabolito 5-fluoro-orótico, seguidos de selección positiva de su presencia por prototrofia, para llegar a un paso final de selección negativa con 5-fluoro-orótico (Tamakoshi y cols., 1999. citado *at supra*). Existen en el estado de la técnica mutaciones en la bacteria *Thermus thermophilus* en las proteínas S12 de la subunidad pequeña del ribosoma o en el propio ARN 16S, como las responsables de uno u otro fenotipos de resistencia o dependencia a estreptomicina (Gregory y cols.,

2001. Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. J. Mol. Biol. Vol. 309:333-338), aunque en ninguno de estos casos se ha descrito el polinucleótido que comprende la doble mutación, ni los mutantes sencillos, que constituyen el objeto de la presente invención.

Compendio de la invención

A partir de mutantes espontáneos de *Thermus thermophilus HB27* crecidos en estreptomicina, los inventores han aislado una proteína S12 mutada (en ocasiones denominada proteína S12* en esta descripción) y, sorprendentemente, han descubierto que la expresión del gen que codifica dicha proteína S12* de *Thermus* spp. confiere un fenotipo de dependencia a estreptomicina, surgiendo como un nuevo marcador de selección termoestable en la generación de plásmidos de clonaje y/o de expresión para la producción de proteínas de interés en organismos termófilos del género *Thermus* spp. Adicionalmente, tal como se muestra en los ejemplos que acompañan a la presente descripción, dicho nuevo marcador de selección termoestable para especies del género *Thermus* spp. puede tener otras aplicaciones biotecnológicas, como la obtención de mutantes de deleción de *Thermus* spp. de genes específicos.

La invención se relaciona, en general, con un marcador de selección termoestable útil en la manipulación genética de bacterias del género *Thermus* spp., como por ejemplo, en la producción de proteínas de interés industrial procedentes de *Thermus* spp., en la obtención de mutantes de deleción dirigida de genes concretos, u otras aplicaciones de interés biotecnológico. A modo ilustrativo, dicho marcador de selección es un polinucleótido que comprende el gen rpsL mutado de *Thermus* spp. que codifica una proteína S12 mutada de *Thermus* spp.

Por tanto, en un aspecto la invención se dirige a un polinucleótido aislado constituido por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 1, o una proteína funcionalmente equivalente. Dicha proteína constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otros aspectos, la invención se relaciona con un ácido nucleico que comprende un polinucleótido según se describe en la presente invención, y con una construcción génica que comprende dicho ácido nucleico donde, además, dicha construcción génica puede contener un marcador de selección adicional, tal como un gen de resistencia a antibiótico, y/o un origen de replicación en *Thermus* spp.

Adicionalmente, en otro aspecto, la invención se dirige a un vector que comprende un polinucleótido, un ácido nucleico o una construcción génica según se describen en la presente descripción.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una bacteria del género *Thermus* spp. que comprende un polinucleótido, un ácido nucleico, una construcción génica o un vector según la invención.

Por otro lado, en otro aspecto la invención hace referencia a una composición que comprende las bacterias del género *Thermus* spp. descritas en la presente descripción.

Los diferentes usos del polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica y el vector definidos en la presente descripción constituyen aspectos inventivos adicionales.

Dicho polinucleótido, ácido nucleico, construcción génica y vector pueden emplearse como un marcador de selección termoestable, o para proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente a una bacteria termófila del género *Thermus* spp., o para el diseño de un plásmido termoestable para expresar un gen de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

Por tanto, en la presente invención se describen métodos para proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente a una bacteria termófila del género *Thermus* spp., y para el diseño de un plásmido termoestable para expresar un gen de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

Aspectos adicionales de la invención, lo constituyen un método para producir una proteína de interés en bacterias termófilas del género *Thermus* spp. y un método para obtener mutantes de deleción dirigida de genes específicos en bacterias termófilas del género *Thermus* spp., que comprenden el empleo de una construcción o en un vector según la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema de los plásmidos pS18a y pS19a. Se muestra un esquema de los plásmidos donde se indica su tamaño en kilopares de bases (kbp), la posición de del gen de resistencia a betalactámicos en *E. coli* (amp^r) y el gen de dependencia de estreptomicina (gen rpsL*) objeto de la presente invención. También se indican la posición del sitio de clonaje múltiple (MCS) y la orientación del promotor de la lactosa (flecha) derivados de los plásmidos pUC18 y pUC19.

La Figura 2 es un esquema de los plásmidos pMS18 y pMS19. Se muestra un esquema de los plásmidos donde se indica su tamaño en kilopares de bases (kbp), la posición y orientación del gen de resistencia a betalactámicos en *E. coli* (gen amp^r) y del gen de dependencia de estreptomicina (gen rpsL*) objeto de la presente invención, y la región de ADN necesaria para la replicación en *Thermus* spp., incluyendo al gen repA. También se indican la posición del sitio

de clonaje múltiple (MCS) y la orientación del promotor de la lactosa (flecha) derivados de los plásmidos pUC18 y pUC19.

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra el número de transformantes obtenidos en placas con estreptomicina. Se representa gráficamente el número de colonias de *Thermus thermophilus* capaces de crecer en placas de medio nutritivo con estreptomicina a las concentraciones indicadas como consecuencia de la transformación con los plásmidos pS18a (círculos blancos) o pMS18 (círculos negros), frente al número de mutantes espontáneos obtenido (cuadrados negros).

La Figura 4 es una representación gráfica que muestra la expresión del gen bgaA desde pS18a y pMS18. Se representa, en forma de barras con su desviación estándar correspondiente, los valores de las actividades beta-galactosidasas en unidades arbitrarias de la estirpe silvestre (wt) y de las estirpes transformadas con pS18bgaA (pS) y pMS18bgaA (pM).

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la expresión de la actividad del gen PhoA en mutantes phoA::kat. Se muestran los valores de actividad fosfatasa hiperalcalina alcanzados por una cepa de *Thermus thermophilus* mutante phoA::kat transformada con los plásmidos pS18phoA (pS) o pMS18phoA (pM) frente a los de la misma cepa sin transformar (-).

La Figura 6 muestra la secuencia del gen rpsL* (gen rpsL mutado de *T. thermophilus*) que confiere dependencia a estreptomicina en *Thermus* spp. Se indica la secuencia de las dos hebras del ADN, y se marca en negrita las dianas de restricción para la enzima NdeI incluidas durante el proceso de amplificación, así como los cambios observados en la secuencia de la zona codificante (secuencia subrayada) con respecto al gen silvestre. La traducción a proteínas de este gen se muestra bajo la secuencia del ADN, indicando con doble subrayado y en negrita, la posición y carácter de las dos mutaciones identificadas.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto la invención se relaciona con un polinucleótido aislado constituido por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 1, o una proteína funcionalmente equivalente.

Dicha proteína, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 1, o una proteína funcionalmente equivalente de la misma, constituye un aspecto adicional de esta invención.

Dicha proteína, es una variante o forma mutada de la proteína S12 de *Thermus thermophilus*. Por este motivo, en ocasiones, dicha proteína ha sido identificada como proteína S12* en esta descripción.

La secuencia de aminoácidos de la proteína S12* codificada por el polinucleótido de la invención presenta las mutaciones K47R y K57E, tal como se muestra en la Figura 6 de la presente descripción.

La secuencia de aminoácidos de la proteína S12 silvestre de una cepa de *T. thermophilus* está disponible en la base de datos del National Center for Biotecnology Information (NCBI) con el número de acceso YP_005302. Cuando en dicha secuencia de aminoácidos la lisina en posición 46 es sustituida por arginina (K46R) y la lisina en posición 56 es sustituida por ácido glutámico (K56E) se obtiene una proteína S12 de *T. thermophilus* mutante funcionalmente equivalente a la proteína S12* codificada por el polinucleótido de la invención, en la que las dos valinas presentes en las posiciones 1 y 2 de la SEQ ID NO: 1 han sido reemplazas por una metionina. El experto en la materia entiende que, dependiendo de la base de datos consultada, la secuencia de aminoácidos mostrada de la proteína S12 silvestre de *T. thermophilus* puede variar de longitud, debido a los diferentes métodos empleados en la resolución de la secuencia de aminoácidos o de la cepa concreta de origen y que por tanto, el número de referencia correspondiente a la posición de los restos de lisina que van a ser sustituidos puede cambiar. Por ejemplo, la base de datos NCBI se basa en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen, mientras que en otras como UNIPROTKB/SWISS-PROT se muestran sólo los aminoácidos que aparecen definidos en la estructura de S12 resuelta mediante rayos X, y de la que faltan los primeros aminoácidos codificados por el gen. No obstante, para el experto en la materia resulta obvio que, comparando la secuencia de aminoácidos de la proteína S12 de *T. thermophilus* de la base de datos del NCBI con la secuencia de aminoácidos de dicha proteína en otra base de datos, se puede deducir la posición de las lisinas que van a ser sustituidas por arginina y ácido glutámico para obtener la proteína S12* de *T. thermophilus*. Por ejemplo, si se obtiene la secuencia de aminoácidos de la proteína S12 silvestre de *T. thermophilus* de la base de datos SWISS-PROT (Entry name RS 12_THET2 y Primary accession number P61941), las lisinas que van a ser sustituidas por arginina y ácido glutámico en la proteína S12 silvestre para obtener la proteína S12* de *T. thermophilus*, funcionalmente equivalente a la proteína codificada por el polinucleótido de la presente invención, corresponden a las posiciones 43 y 53 respectivamente.

En la presente descripción, se entiende por "proteína funcionalmente equivalente" I aquella proteína que, aunque presente diferencias puntuales en su secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, conserva la capacidad de conferir un fenotipo dependiente de estreptomicina a bacterias termófilas del género *Thermus* spp., tal como se describe en la presente invención. Por ejemplo, la proteína S12* de *T. thermophilus* descrita en la SEQ ID NO: 1, la proteína S12 de *T. thermophilus* descrita bajo el número de acceso YP_005302 que presenta las sustituciones K46R y K56E, y la proteína S12 de *T. thermophilus* descrita bajo el número de acceso

P61941 que presenta las sustituciones K43R y K53E, son proteínas funcionalmente equivalentes porque todas, cuando están presentes en una especie del género *Thermus* spp., confieren un fenotipo dependiente de estreptomicina. Las expresiones "conferir dependencia a estreptomicina", "conferir un fenotipo dependiente de estreptomicina" y "proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente" son equivalentes y, por tanto, se emplean indistintamente a lo largo de la descripción.

El experto en la materia entiende que las sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no criticas para la funcionalidad de la proteína observadas al comparar las secuencias de la proteína S12 de distintas cepas de *Thermus* spp., son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Por tanto, la proteína S12* de *T. thermophilus* codificada por el polinucleótido de la invención puede contener "mutaciones conservativas" sin que ello altere su capacidad funcional. La capacidad de conferir dependencia a estreptomicina puede ser evaluada mediante un ensayo similar al descrito en el Ejemplo 2 a partir de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína funcionalmente equivalente a ensayar.

En una realización particular, el polinucleótido de la invención está constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [gen rpsL mutado (gen rpsL*) de *T. thermophilus*]. Dicha SEQ ID NO: 2 corresponde a una variante del gen rpsL de *T. thermophilus* que contiene los nucleótidos que codifican las mutaciones en las posiciones 47 y 57 de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 puede verse en la Figura 6 (secuencia subrayada) con respecto al gen silvestre.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico, en adelante, ácido nucleico de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención. Dicho ácido nucleico puede estar comprendido dentro de una construcción génica, donde puede estar acompañada de otras secuencias de ácido nucleico tales como secuencias reguladoras de la expresión, secuencias que codifiquen marcadores de selección, orígenes de replicación, etc.

Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con una construcción génica, de aquí en adelante, construcción génica de la invención, que comprende el ácido nucleico de la invención.

En una realización particular, la construcción génica de la invención comprende, además, un marcador de selección. Los marcadores de selección son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Estos marcadores de selección o genes de selección pueden ser genes de resistencia antibióticos, genes reporteros, como el gen que codifica la beta-galactosidasa del operón lactosa, etc...

Por tanto, en otra realización particular, la invención se relaciona con una construcción génica de la invención, donde dicha construcción comprende, además, un marcador de selección y dicho marcador de selección es un gen de resistencia.

En el estado de la técnica existen múltiples genes de resistencia que pueden ser empleados en la construcción génica de la invención. Los genes de resistencia más habituales son aquellos que proporcionan resistencia a antibióticos, es decir, permiten al organismo que expresa dichos genes sobrevivir en presencia del antibiótico en cuestión. Ejemplos de dichos genes de resistencia a antibióticos son, por ejemplo, genes de resistencia a beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, etc), a eritromicina, a kanamicina, a neomicina, a gentamicina etc. Entre las penicilinas podemos encontrar, entre otros, bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, etc. Adicionalmente, si se desea, dichos genes de resistencia a antibióticos pueden ser genes de resistencia termoestables con la finalidad de que puedan expresarse adecuadamente en *Thermus* spp. Un ejemplo de gen de resistencia termoestable es, por ejemplo, el gen quimérico de resistencia termoestable a kanamicina (Moreno, R., 2004. Clonaje de enzimas termoestables de interés biotecnológico y desarrollo de herramientas para su expresión en *Thermus thermophilus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias).

Así, en una realización particular, la construcción de la invención comprende, además, el gen quimérico de resistencia termoestable a kanamicina.

Por otro lado, la construcción de la invención puede contener un origen de replicación funcional en *Thermus* spp. que permita a dicha construcción, cuando es insertada en un vector adecuado, replicarse dentro de una bacteria del género *Thermus* spp. Por tanto, en otra realización particular, la construcción de la invención comprende un origen de replicación en *Thermus* spp. Las distintas técnicas y procedimientos de obtención de construcciones génicas pueden encontrarse en Sambrook y cols., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3red ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

El polinucleótido de la invención o el ácido nucleico de la invención o la construcción génica de la invención, puede estar contenido dentro de un vector apropiado para su clonaje en una célula huésped. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, que comprende un polinucleótido, un ácido nucleico o una construcción génica según la presente invención. Como entiende el experto en la materia, dicho vector puede contener, entre otras cosas, sitios de clonaje múltiple para insertar genes de interés, secuencias reguladoras de la expresión y orígenes de replicación adecuados a la célula huésped donde se va a introducir el vector.

Por tanto, la invención se relaciona en otro aspecto con una bacteria del género *Thermus* spp., en adelante bacteria de la invención, que comprende el polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica o el vector de la invención.

En una realización particular, dicha bacteria del género *Thermus* spp. se selecciona entre, *T. brockianus, T. scotoductus, T. filiformis*, y *T. oshimai*, preferentemente, *T. thermophilus* y *T. aquaticus*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende las bacterias de la invención. Dicha composición contiene todos los componentes necesarios para mantener la viabilidad de las bacterias, tales como reguladores del pH, nutrientes, etc.

Los diferentes usos del polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica y el vector de la invención constituyen aspectos inventivos adicionales.

Dichos polinucleótido, ácido nucleico, construcción génica y vector de la invención pueden emplearse como un marcador de selección termoestable para su empleo en bacterias del género *Thermus* spp. Dicho marcador de selección termoestable permite, cuando se introduce en una bacteria del género *Thermus* spp., seleccionar aquellas bacterias que contengan dicho marcador. Si dicho marcador se introduce en una célula bacteriana del género *Thermus* spp. junto con un gen que codifica una proteína de interés, entonces dicho marcador permite la selección de las bacterias que hayan introducido el gen que codifica la proteína de interés.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo del polinucleótido, el ácido nucleico o la construcción génica de la invención como marcador de selección termoestable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica o el vector de la invención para proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente a una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

Por tanto, en un aspecto la invención se relaciona con un método para proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente a una bacteria termófila del género *Thermus* spp. que comprende el empleo del polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica o el vector de la invención. Brevemente, dicho método consiste en introducir el polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica o el vector de la invención, mediante cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, mediante transformación, en una bacteria del género *Thermus* spp. Cuando dicho polinucleótido, ácido nucleico, construcción génica o vector de la invención se expresa adecuadamente en dicha bacteria, ésta adquiere un fenotipo estreptomicina dependiente. Los distintos procedimientos de introducir material genético en una célula se describen ampliamente en la literatura científica, tal como Sambrook y cols. (citado *at supra*).

En una realización particular, bacteria termófila del género *Thermus* spp. pertenece a las especies *T. thermophilus, T. aquaticus, T. brockianus, T. scotoductus, T. filiformis* y *T. oshimai*.

Una de las principales aplicaciones de la materia descrita en la presente invención es la producción de proteínas de interés industrial en especies del género *Thermus* spp. Tal como se ha indicado en los antecedentes de la invención, existen una gran cantidad de proteínas termófilas de interés industrial cuya especial estructura hace necesario emplear como factoría celular (o célula huésped) para su producción, el organismo termófilo del que procede dicha proteína termófila en lugar de los organismos modelos habituales, tales como *E. coli* o *S. cerevisiae*. Como entiende el experto en la materia, el clonaje del gen que codifica la proteína de interés debe efectuarse a través de un plásmido o vector apropiado a la célula que va a ser empleada como factoría celular, por lo que si se va emplear como factoría celular un organismo termófilo, tal como *Thermus* spp., el plásmido diseñado para tal fin debe ser termoestable, es decir, tiene que ser funcional a las temperaturas a las que se desarrollan dichos microorganismos termófilos, las cuales se encuentran entre los 40ºC y 85ºC. En el diseño de dichos plásmidos se pueden incluir orígenes de replicación, secuencias reguladoras de la expresión, secuencias de recombinación homólogas, etc. o marcadores de selección que permitan seleccionar la bacteria que ha incorporado el gen que codifica para la proteína de interés.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona el empleo de un polinucleótido, un ácido nucleico o una construcción génica de la invención en el diseño de un plásmido termoestable para expresar genes de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

Análogamente, la invención se relaciona con un método para el diseño de un plásmido termoestable para expresar genes de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp., que comprende el empleo del polinucleótido, el ácido nucleico o la construcción génica de la invención. Brevemente, dicho método consiste en insertar el polinucleótido, el ácido nucleico o la construcción génica de la invención en un plásmido, convirtiendo a dicho plásmido en un plásmido termoestable para expresar un gen de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp. Los distintos procedimientos de insertar material genético en un plásmido son ampliamente conocidos por el experto en la materia y se recogen en la literatura científica, tal como Sambrook y cols. (citado *at supra*).

En una realización particular, dicho plásmido termoestable es un plásmido integrativo o replicativo. La selección del tipo de plásmido, replicativo o integrativo, para la donación del gen que codifica la proteína de interés dependerá de la finalidad.

En la presente descripción, se entiende por plásmido integrativo aquel plásmido que recombina con zonas homólogas del genoma de las células que sirven como factoría celular asegurando así la mayor estabilidad del plásmido,

y por plásmido replicativo aquel que puede replicarse en la célula que sirve como factoría celular aumentando así el número de copias de dicho plásmido.

Los vectores replicativos están dirigidos, esencialmente, a una mayor producción de proteína al encontrarse el gen que codifica dicha proteína en multicopia, como se muestra en el Ejemplo 4.

Los vectores o plásmidos integrativos son útiles para expresar genes desde copia única en el cromosoma, algo útil para estudios de complementación de mutaciones (Ejemplo 5 que acompaña a la presente descripción), o para trabajos de estabilización de enzimas mesófilas mediante selección térmica o para el aislamiento de mutantes de deleción "limpios" mediante retrorecombinación, como se muestra en el Ejemplo 6 que acompaña a la presente descripción.

Son muchas las bacterias del género *Thermus* spp. que pueden servir como factoría celular para la producción de proteínas de interés de origen termófilo. En una realización particular, dicha bacteria termófila del género *Thermus* spp. pertenece a las especies *T. thermophilus, T. aquaticus, T. brockianus, T. scotoductus, T. filiformis* y *T. oshimai*.

Las proteínas de interés industrial procedentes de bacterias termófilas son muy numerosas y tienen amplias aplicaciones tanto en la industria como en técnicas de biología molecular. Dichas proteínas de interés son codificadas por lo que en esta descripción se ha denominado "gen de interés". En una realización particular de la invención, el gen de interés codifica una proteína de interés, preferentemente, una enzima. De especial interés son las enzimas termoestables "Taq" ADN polimerasa, aldolasa, numerosas proteasas, lipasas, pululanasas, alfa y beta glucosidasas, galacturonasas, esteraras, fosfatasas, alcohol deshidrogenasas, enzimas de modificación de ADN o ARN (Lioliou y cols., 2004, *Thermus thermophilus* genome analysis: benefits and implications, Microbial Cell Factories, 3:1-5; Bruins y cols., Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents Appl Biochem Biotechnol. 2001 Feb;90(2):155-86).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir una proteína de interés en bacterias termófilas del género *Thermus* spp. que comprende

a) introducir el gen que codifica dicha proteína de interés en una construcción génica o en un vector según la presente invención, bajo el control de un promotor,

b) transformar células del género *Thermus spp*. con la construcción génica o el vector obtenido en la etapa (a),

c) seleccionar las colonias transformantes sobre placas que contienen estreptomicina, y

d) incubar las células obtenidas a partir de las colonias transformantes de la etapa (c) bajo condiciones apropiadas para expresar el gen de interés.

Procedimientos sobre cómo introducir genes en construcciones génicas o vectores y cómo transformar células con construcciones génicas o vectores, están ampliamente descritos en el estado de la técnica y son conocidos por el experto en la materia. Asimismo, el gen que codifica la proteína de interés debe estar bajo el control de un promotor, o secuencia reguladora, que permita de forma adecuada la expresión de dicho gen en una célula del género *Thermus* spp.

La selección de las colonias transformantes según se especifica en el apartado (c) se lleva a cabo sobre placas que contienen estreptomicina en una concentración suficiente, preferentemente entre 10 y 500 mg/L, para poder diferenciar las colonias transformantes de las que no lo son. En particular, una concentración preferida de estreptomicina para este propósito es 100 mg/L tal como se emplea en los Ejemplos que acompañan a la presente descripción.

Una vez seleccionadas las colonias transformantes, el método implica incubar las células obtenidas a partir de dichas colonias transformante bajo condiciones apropiadas para expresar el gen de interés, es decir, incubar las células con la temperatura, pH, nutrientes, etc. adecuadas para que la célula pueda crecer y desarrollarse y, como consecuencia, se exprese el gen de interés. Por ejemplo, la temperatura puede estar comprendida, aproximadamente, entre 40ºC y 85ºC.

Otra de las aplicaciones que presenta la materia descrita en la invención, es decir, el polinucleótido, el ácido nucleico, la construcción génica o el vector de la invención, es la obtención de mutantes de deleción dirigida de genes específicos en bacterias termófilas del género *Thermus* spp., tal como se muestra en el Ejemplo 6 que acompaña a la presente descripción.

La obtención de mutantes de deleción dirigida de genes específicos es útil en la obtención de cepas donde se han eliminado actividades no deseadas en procesos de bioconversión, o en donde se quiera sustituir un gen termoestable por otro procedente de un organismo mesófilo con idea de termoestabilizar éste mediante un proceso de selección funcional a temperaturas crecientes. Un ejemplo paradigmático fue publicado por Tamakoshi y cols. en 2001 (Selection of stabilized 3-isopropylmalate dehydrogenase of *S. cerevisiae* using the host-vector system of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, Extremophiles, 5: 17-229) quienes mostraron la posibilidad de seleccionar formas termoesta-

bles de la 3-isopropil malato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* mediante la complementación a temperaturas crecientes de un mutante leuB de *T. thermophilus* que previamente habían obtenido por selección genética.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el empleo del vector de la invención para obtener un mutante de deleción dirigida de un gen específico en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un mutante de deleción dirigida un gen específico en una bacteria termófila del género *Thermus* spp. que comprende

a) introducir las regiones que flanquean el gen diana a eliminar de dicha bacteria termófila en una construcción o en un vector según la presente invención,

b) transformar dicha bacteria termófila con la construcción o el vector obtenido en la etapa (a),

c) seleccionar las colonias transformantes sobre placas que contienen estreptomicina,

d) resuspender las colonias seleccionadas en la etapa (c) y extenderlas sobre un medio de cultivo carente de estreptomicina, y

e) identificar por métodos genéticos el mutante de deleción de entre las colonias obtenidas en la etapa (d).

Un ejemplo ilustrativo de cómo llevar a cabo dicho método se recoge en el Ejemplo 6, donde el gen a eliminar en una bacteria termófila del género *Thermus* spp. es el gen narC de *T. thermophilus*, que codifica un citocromo c de localización periplasmática necesario para la síntesis de nitrato reductasa. Como entiende el experto en la materia, después de transformar una bacteria termófila del género *Thermus* spp. con una construcción génica o un vector según se define en la etapa (a) del presente método, es necesario cultivar dicha bacteria termófila transformada el tiempo suficiente (de 1 a 4 horas) para permitir la recombinación homóloga entre una construcción o un vector según la presente invención que contiene las regiones que flanquean el gen diana a eliminar y el genoma de la bacteria termófila que se ha transformado.

Análogamente al método descrito en la presente invención para producir una proteína de interés, en el método para obtener mutantes de deleción dirigida de genes, la selección de las colonias transformantes se lleva a cabo sobre placas que contienen estreptomicina en una concentración suficiente, preferentemente entre 10 y 500 mg/L, para poder diferenciar las colonias transformantes de las que no lo son. En particular, una concentración preferida de estreptomicina para este propósito es 100 mg/L tal como se emplea en los Ejemplos que acompañan a la presente descripción.

En la presente descripción, se entiende por métodos genéticos todos aquellos métodos empleados en ingeniería genética y biología molecular que permiten identificar y, por tanto, distinguir, un genoma de otro. Ejemplos de dichos métodos genéticos son, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación con sondas radiactivas específicas del gen sobre fragmentos de restricción separados mediante electroforesis (Southern Blot), la utilización de sondas radiactivas específicas del gen sobre colonias individuales, etc. En la presente invención, el método genético seleccionado para identificar el mutante de deleción de entre las colonias de la etapa (d) del presente método, es PCR de ADN genómico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no pretenden limitar el contenido de la misma.

Ejemplos

En los Ejemplos que acompañan a esta descripción se utilizaron los materiales y métodos que se describen a continuación.

Materiales y métodos

Cepas Bacterianas

En la realización de los siguientes ejemplos se empleó la cepa silvestre de *Thermus thermophilus* HB27 [Koyama Y. y cols., 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. J. Bacteriol. Vol. 166: 338-340,], la cepa *Thermus thermophilus* mutante para el gen phoA [Moreno, R., 2004. Clonaje de enzimas termoestables de interés biotecnológico y desarrollo de herramientas para su expresión en *Thermus thermophilus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid] y la cepa anaerobia facultativa *Thermus thermophilus* HB27::nar (Ramírez-Arcos y cols, 1988, Anaerobic Growth, a Property Horizontally Transferred by an Hfr-Like Mechanism among Extreme Thermophiles. Journal of Bacteriology, 180: 3137-3143).

La cepa de *E. coli* DH5α (*supE44* Δ*lacU169* (ø80 *lacZ*Δ*AM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) [Hanahan, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. Vol. 166, 557-580, 1983] se empleó para la obtención de los plásmidos pS18a y pMS18 y de sus derivados.

Medios de cultivo

Las cepas de *Thermus* spp. fueron cultivadas en medio TB compuesto de: 8 g/L de Tripticasa de la casa Becton Dickinson and Company (BD, Ref 211921), 4 g/L de extracto de levadura (BD, Ref: 212750), 3 g/L de NaCl (Merck), ajustado a pH 7,5 con NaOH. Para preparar medio sólido se añadió a este medio 15 g/L de agar 7,5 (PRONADISA). Cuando fue necesario, se añadieron a los medios de cultivo estreptomicina (10-500 mg/L) o de kanamicina (20-100 mg/L).

E. coli se cultivó en medio LB (Lennox, E. X. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology. Vol. 1:133-141), o en su forma solidificada por adición de agar (15 g/L). Para la selección de plásmidos se añadió ampicilina (100 mg/L) a estos medios.

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, de la casa comercial Fermentas, empleadas en los ejemplos que ilustran la presente invención fueron las siguientes: NdeI [clonaje del gen rpsL*]; XbaI y HindIII (clonaje del gen bgaA); y XhaI y HindIII (clonaje del gen phoA).

Vectores de clonación

Los vectores empleados para la construcción de los plásmidos integrativos o replicativos descritos en la presente invención fueron los plásmidos pUC18 y pUC19 de *Escherichia coli* (Viera y Messing, 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. Vol. 19:259-269), el vector pMK18 (Grado y cols. 1999. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. Plasmid. Vol. 42:241-245), el vector pMKEbgaA (Moreno y cols. 2003. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. Plasmid. Vol. 49:2-8) y el plásmido pMKEphoA (Moreno y cols. 2003, citado *supra*).

El número de copia por célula de los plásmidos replicativos se comparó con el de pMK18 mediante extracción y análisis de la concentración extraída de una cantidad equivalente de células de *T. thermophilus* HB27 transformadas con cada uno de ellos.

Métodos de transformación

Las cepas de *Thermus thermophilus* se transformaron mediante competencia natural según lo descrito en Koyama y cols. 1986. [Koyama y cols., 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and other *Thermus* spp. J. Bacteriol. Vol. 166:338-340].

E. coli se transformó empleando el método descrito por Hanahan, D. 1983 [Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. Vol. 166: 557-580].

*Método de secuenciación del gen rpsL**

El gen rpsL* fue secuenciado por métodos automáticos basados en la utilización de dideoxinucleótidos en un secuenciador de Applied Biosystems. La presencia de las mutaciones en la secuencia de aminoácidos fue deducida de la secuencia de ADN.

Ensayo de la actividades beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina

La actividad termoestable β-galactosidasa producto del gen bgaA empleada en los Ejemplos 3 y 4 se midió a 70ºC en la fracción soluble de células rotas mediante sonicación según se describe en Moreno y cols. 2002 [Moreno y cols., 2002. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. Plasmid. Vol. 49:2-8,] sobre el sustrato cromogénico o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido (ONPG). La actividad fosfatasa alcalina empleada en el Ejemplo 5 se midió sobre fracciones solubles empleando el sustrato p-nitrofenil-fosfato. La reacción se llevó a cabo a 70ºC en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 10. La actividad de ambas enzimas, medida como la cantidad necesaria para transformar 1 μmol de sustrato por minuto, fue normalizada con respecto a la masa celular para efectuar las comparaciones entre muestras del mismo ensayo.

Ejemplo 1

Obtención del gen de dependencia a estreptomicina y su clonación en vectores de expresión

El gen de dependencia a estreptomicina se obtuvo mediante el aislamiento de mutantes espontáneos de la cepa *Thermus thermophilus* HB27. Para ello, se llevó a cabo la extensión de cultivos densos de dicha cepa sobre placas de medio nutritivo conteniendo 100 mg/L del antibiótico estreptomicina, y se obtuvieron preparaciones de ADN total de 10 de ellos. El gen rpsL* que codifica la proteína S12* de cada uno de estos mutantes se amplificó mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores O-str1 (SEQ ID NO: 3) y O-str2 (SEQ ID NO: 4).

Cantidades idénticas de los fragmentos de ADN así amplificados se emplearon individualmente para transformar mediante competencia natural (Koyama y cols. 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and other *Thermus* spp. J. Bacteriol. 166:338-340) la cepa parental de *Thermus thermophilus* HB27 sensible a estreptomicina, y se seleccionaron aquellas cepas capaces de generar mayor número de colonias sobre placas de medio nutritivo conteniendo 100 mg/L de estreptomicina. Estas colonias se replicaron en placas con y sin estreptomicina, seleccionando aquellas que contenían el gen rpsL mutado (gen rpsL*) [SEQ ID NO: 2] cuya presencia impedía el crecimiento en ausencia de estreptomicina. Su traducción a proteína [SEQ ID NO: 1] presenta dos cambios de aminoácidos, lisina 46 por arginina (K46R) y lisina 56 por ácido glutámico (K56E), con respecto la secuencia correspondiente al gen natural presente en la cepa parental (ProteinBank (NCBI), YP_005302).

El gen arriba descrito objeto de esta invención (gen rpsL*) fue integrado en la diana NdeI de los plásmidos pUC18 y pUC19 de *Escherichia coli* para generar los vectores pS18a y pS19a respectivamente (Figura 1). Dichos vectores se pueden replicar en *Escherichia coli*, donde confieren resistencia a beta-lactámicos, pero no pueden replicar en *Thermus* spp., donde sin embargo pueden conferir dependencia de estreptomicina mediante su inserción en el cromosoma a través de los mecanismos de recombinación homóloga.

Para obtener un plásmido que replicara en *Thermus* ssp., se amplificó por PCR la secuencia de ADN correspondiente al origen de replicación autónoma del vector pMK18 mediante los cebadores O-repnde2d (SEQ ID NO: 5) y O-repnder (SEQ ID NO: 6), y el producto de amplificación se clonó en derivados de los vectores pS18a y pS19a poseedores de una única diana de restricción NdeI, dando lugar a los vectores pMS18 y pMS19 respectivamente (Figura 2). Éstos son capaces de replicar en *Escherichia coli*, confiriendo resistencia a β-lactámicos, y también en *Thermus* spp., donde generan dependencia de estreptomicina. El número de copia por célula de los plásmidos replicativos es similar al descrito para el plásmido pMK18, según se deduce de la comparación de las concentraciones respectivas obtenidas a partir del mismo número de células transformadas.

Ejemplo 2

Dependencia a estreptomicina conferida por los vectores pSl8a y pMS18

Cultivos en fase exponencial de la cepa *Thermus thermophilus* HB27 crecida hasta una densidad óptica (OD) a 550 nm de 0,5 (espectómetro Hitachi U-2000), se transformaron con cantidades idénticas (200 ng) de los plásmidos pS18a y pMS18, disponiéndose también de controles no transformados. Tras un periodo de incubación de 4 horas a 70ºC con agitación, 100 μL de cada transformación se extendieron sobre placas de medio nutritivo para *Thermus* ssp. conteniendo concentraciones crecientes de estreptomicina (100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L). Las placas se incubaron a 70ºC durante 48 horas, antes de proceder al contaje del número de colonias crecidas en cada una de ellas. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 3, confirman que la transformación con los plásmidos pS18a y pMS18 genera un número de colonias en placas conteniendo 100 mg/L de estreptomicina entre 30 y 300 veces superior al de mutantes espontáneos que aparecen en las placas control. Cuando un número representativo de colonias (300 aproximadamente) resultantes de cada transformación se resuspendió hasta una OD a 550 nm de 0,5 en medio TB sin estreptomicina, y extendido posteriormente sobre placas sin el antibiótico, se detectó un número inferior a 10 colonias tras un periodo de incubación de 48 horas a 70ºC, mientras que apareció un césped bacteriano cuando se extendió un control equivalente de células no transformadas. Estos resultados muestran la alta eficiencia del gen empleado en los vectores para ser seleccionados en presencia de estreptomicina y producir una fuerte dependencia de este antibiótico para crecer.

Ejemplo 3

Inserción en el cromosoma de una beta-galactosidasa termoestable (bgaA) en un fondo genético silvestre

El gen bgaA codifica una beta-galactosidasa termoestable procedente de la cepa *Thermus* spp. ATCC 27737 que se puede expresar en *Thermus thermophilus* HB27::nar desde el vector pMKEbgaA (Moreno y cols., 2002, citado *supra*). Utilizando las enzimas de restricción XbaI y HindIII, el gen bgaA unido al promotor inducible por nitrato y anoxia del vector pMKEbgaA fue insertado en las dianas equivalentes del plásmido pS18a y la construcción resultante, denominada pS18bgaA, fue empleada para transformar la cepa silvestre *Thermus thermophilus* HB27 y se crecieron en placas de medio nutritivo con estreptomicina, seleccionando derivados dependientes de estreptomicina por inserción del plásmido en el cromosoma. Tras el proceso de inducción se comprobó que las cepas dependientes de estreptomicina que habían incorporado el plásmido eran capaces de expresar entre 6 y 10 veces más actividad beta-galactosidasa termoestable que la cepa parental transformada con el plásmido pS18a como control (Figura 4).

Ejemplo 4

Clonaje en multicopia del gen bgaA

Utilizando la misma estrategia explicada en el ejemplo anterior, el gen bgaA y su promotor inducible fueron donados en el plásmido pMS18 y la construcción resultante, denominada pMS18bgaA, se empleó para transformar la cepa silvestre *Thermus thermophilus* HB27::nar. Los transformantes que crecieron en placas de medio nutritivo con estreptomicina presentaron tras el proceso de inducción una actividad beta-galactosidasa 20 a 30 veces superior a la de la estirpe silvestre transformada con el plásmido pMS18 como control (Figura 4).

Ejemplo 5

Inserción del gen phoA en un fondo genético phoA::kat resistente a kanamicina

Hasta ahora, la obtención dirigida de mutantes de inserción en *Thermus* spp. ha empleado la kanamicina como único marcador de selección, haciendo al receptor resistente a este antibiótico, y limitando posibles manipulaciones ulteriores por la limitación de marcadores genéticos termoestables aplicables a alta temperatura. Al actuar la kanamicina sobre la síntesis de proteínas (al igual que el gen rpsL) modificando los ribosomas, existía la posibilidad de que se produjera un cierto fondo de resistencia a estreptomicina en los mutantes resistentes a la kanamicina. Para descartar dicha posibilidad, se procedió a insertar el gen phoA en un fondo genético phoA::kat resistente a kanamicina.

El gen phoA codifica una fosfatasa hiperalcalina termoestable de *Thermus thermophilus* (Castán y cols., 2002. The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidences from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. Extremophiles. Vol. 6:225-232) que fue donada y expresada bajo el control de un promotor inducible por anoxia en el plásmido pMKEphoA.

Este gen, y el promotor que lo controla en pMKEphoA, fueron donados tanto en pS18a como en pMS18 empleando las enzimas de restricción XhaI y HindIII Las construcciones resultantes, pS18phoA y pMS18phoA se emplearon después para transformar una cepa de *Thermus thermophilus* mutante en este gen por inserción del gen quimérico de resistencia termoestable a kanamicina (Moreno, R., 2004. Clonaje de enzimas termoestables de interés biotecnológico y desarrollo de herramientas para su expresión en *Thermus thermophilus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias). Las colonias que crecieron sobre placas de medio nutritivo con estreptomicina fueron sometidas a ensayo de la actividad con el sustrato cromogénico para-nitrofenil fosfato a 80ºC y pH 11 tras un proceso de inducción estándar por nitrato y anoxia. Los resultados, que se describen en la Figura 5, demuestran que ambas construcciones recuperan similares niveles de actividad fosfatasa hiperalcalina, lo que demuestra que pueden ser incorporadas a *Thermus* spp. mediante el gen de dependencia a estreptomicina, independientemente del hecho de que la cepa receptora sea ya resistente a kanamicina, un antibiótico que, al igual que la estreptomicina, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas de las bacterias.

Ejemplo 6

Deleción completa del gen narC de Thermus thermophilus

En el presente ejemplo se ha obtenido un mutante de deleción completa del gen narC, codificante de un citocromo C de localización periplásmica necesario para la síntesis de la nitrato reductasa respiratoria de *Thermus thermophilus* (Zafra y cols., 2002. A cytochrome c encoded by the *nar* operon is required for the synthesis of active respiratory nitrate reductase in *Thermus thermophilus*. FEBS Letters. Vol. 523:99-102), y pretende ilustrar la utilización del gen de dependencia de estreptomicina objeto de la presente invención para el aislamiento dirigido de un mutante de deleción sin que quede huella genética alguna de los sistemas empleados para su obtención.

Para ello, el gen narC fue eliminado mediante PCR inversa de un fragmento KpnI-KpnI de 1768 pb religado procedente del plásmido pNIT3 (Ramírez-Arcos, S., Caracterización y transferencia natural de una nitrato reductasa de *Thermus thermophilus* HB8, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1997), empleando para ello los cebadores onarGNdeD (SEQ ID NO: 7 y OcitcNdeR (SEQ ID NO: 8). El producto obtenido fue digerido con la enzima NdeI y religado para obtener una forma circular, que fue posteriormente digerida con la enzima KpnI y donada en el vector pUC19 previamente digerido con la misma enzima. Una vez amplificado el vector así obtenido, se extrajo de él un fragmento de 977 pb mediante digestión con KpnI, que fue donado en el vector pS18a tras la digestión de éste con la misma enzima. La construcción resultante se utilizó para transformar la cepa silvestre *Thermus thermophilus* HB27::nar, seleccionándose aquellas colonias que crecieron en placas de medio nutritivo con estreptomicina. Estas colonias fueron resuspendidas en medio sin estreptomicina, incubadas durante 2 horas a 70ºC, y extendidas sobre placas de medio nutritivo sin dicho antibiótico. Todas las colonias ensayadas que crecieron en estas condiciones habían perdido el vector, encontrando que aproximadamente el 50% de ellas presentaban el gen narC original, mientras que el otro 50% resultaron ser mutantes de deleción completa de éste. De esta forma se demuestra que el crecimiento en medios sin antibióticos sólo es posible en cepas en las que el gen objeto de la presente invención ha sido eliminado mediante procesos de recombinación genética.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado constituido por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 1, o una proteína funcionalmente equivalente.

2. Polinucleótido según la reivindicación 1, cuya secuencia de nucleótidos está constituida por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

3. Un ácido nucleico que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2.

4. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 3.

5. Construcción según la reivindicación 4, donde dicha construcción génica comprende, además, un marcador de selección.

6. Construcción según la reivindicación 5, donde dicho marcador de selección es un gen de resistencia.

7. Construcción según la reivindicación 6, donde dicho gen de resistencia es el gen quimérico de resistencia termoestable a kanamicina.

8. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde dicha construcción comprende, además, un origen de replicación en *Thermus* spp.

9. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico según la reivindicación 3 o una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.

10. Una bacteria del género *Thermus* spp. que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico según la reivindicación 3, una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 o un vector según la reivindicación 9.

11. Bacteria según la reivindicación 10, en donde dicha bacteria del género *Thermus* spp. se selecciona entre *T. brockianus, T. scotoductus, T. filiformis* y *T. oshimai*, preferentemente, *T. thermophilus* y *T. aquaticus*.

12. Una composición que comprende bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.

13. Empleo de un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico según la reivindicación 3, una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, como marcador de selección termoestable.

14. Empleo de un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico según la reivindicación 3, una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o un vector según la reivindicación 9, para proporcionar un fenotipo estreptomicina dependiente a una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

15. Empleo de un polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico según la reivindicación 3, una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para el diseño de un plásmido termoestable para expresar un gen de interés en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

16. Empleo según la reivindicación 15, en donde dicho plásmido es integrativo o replicativo.

17. Empleo de un vector según la reivindicación 9, para obtener un mutante de deleción dirigida de un gen específico en una bacteria termófila del género *Thermus* spp.

18. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde dicha bacteria termófila del género *Thermus* spp. pertenece a las especies *T. thermophilus, T. aquaticus, T. brockianus, T. scotoductus, T. filifbrmis* y *T. oshimai*.

19. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde el gen de interés codifica una proteína, preferentemente, una enzima.

20. Un método para producir una proteína de interés en bacterias termófilas del género *Thermus* spp. que comprende

a) introducir el gen que codifica dicha proteína de interés en una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 o en un vector según la reivindicación 9 bajo el control de un promotor

b) transformar células del género *Thermus* spp. con la construcción génica o el vector obtenido en la etapa (a),

c) seleccionar las colonias transformantes sobre placas que contienen estreptomicina, y

d) incubar las células obtenidas a partir de las colonias transformantes de la etapa (c) bajo condiciones apropiadas para expresar el gen de interés.

21. Un método para obtener un mutante de deleción dirigida de un gen específico en una bacteria termófila del género *Thermus* spp. que comprende

a) introducir las regiones que flanquean el gen diana a eliminar de dicha bacteria termófila en una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 o en un vector según la reivindicación 9,

b) transformar dicha bacteria termófila con la construcción o el vector obtenido en la etapa (a),

c) seleccionar las colonias transformantes sobre placas que contienen estreptomicina,

d) resuspender las colonias seleccionadas en la etapa (c) y extenderlas sobre medio de cultivo carente de estreptomicina, y

e) identificar por métodos genéticos el mutante de deleción de entre las colonias obtenidas en la etapa (d).

22. Una proteína aislada constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una proteína funcionalmente equivalente de la misma.

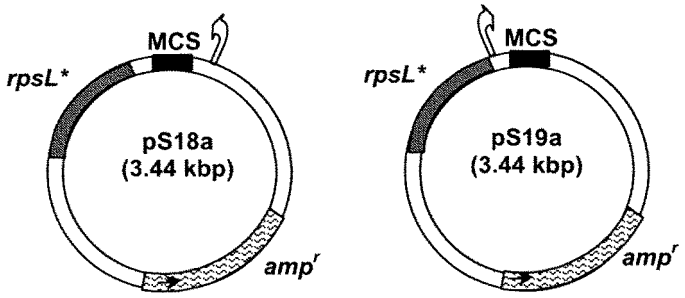


FIGURA 1

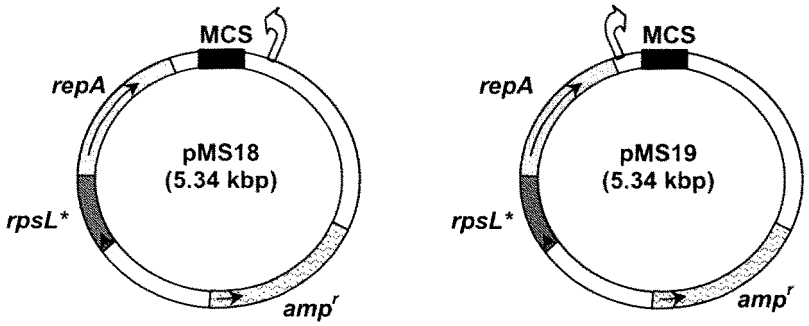


FIGURA 2

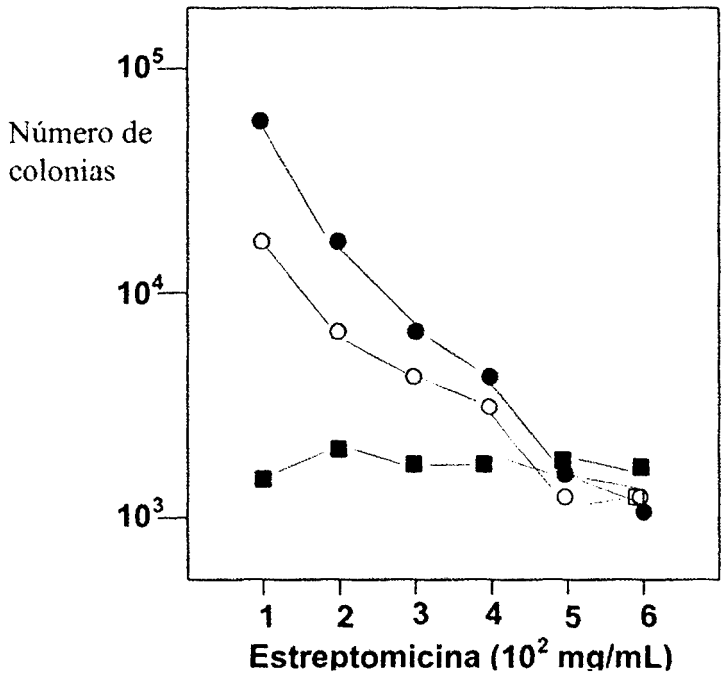

Número de colonias
10^5
10^4
10^3
1
2
3
4
5
6
Estreptomicina (10^2 mg/mL)

FIGURA 3

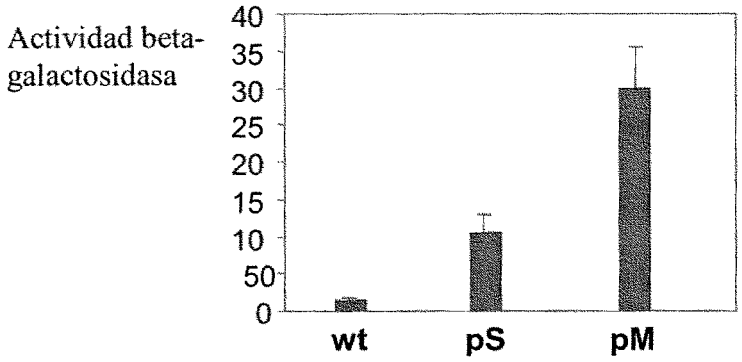


FIGURA 4

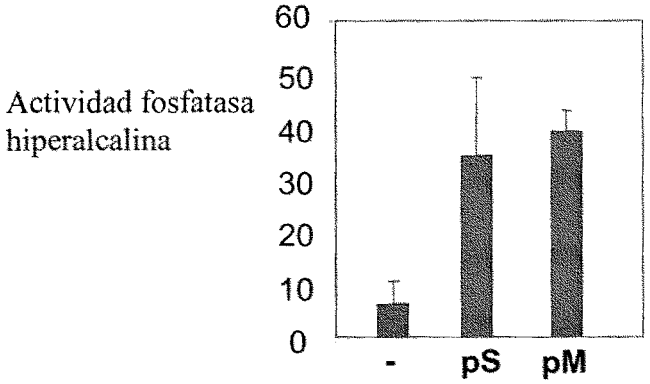


FIGURA 5

CATATGTCCAGGCCC
GTATACAGGTCCGGG

TCCAGGTCCCCCGAGGGGGACTCCCGGCGGACGAAGGCCTCCAGGTCCTTGAGGATCTCGGGGAGGCGGG
AGGTCCAGGGGGCTCCCCCTGAGGGCCGCCTGCTTCCGGAGGTCCAGGAACTCCTAGAGCCCCTCCGCCC

CTTCCATCCAGCGAAGGCTTTCCATGGCCCCCATTATGGCAGGGCCTCGCCTTGGAAGGTATTGCCAAGG
GAAGGTAGGTCGCTTCCGAAAGGTACCGGGGGGTAATACCGTCCCGGAGCGGAACCTTCCATAACGGTTCC

AAGGGTTTTGCCTGTACACTAGGGCAGTTGAGGGCTCTCAGGGCCAGCCCCTGGCCCTGAGGGTGGGCCC
TTCCCAAAACGGACATGTGATCCCGTCAACTCCCGAGAGTCCCGGTCGGGGACCGGGACTCCCACCCGGG

CGTGTGGGGCATCACGGAGGGCGTTCCCCTCCGGGGGGATCTTGAGAACAAGGGGGCAAGTCCAAGAAGA
GCACACCCCGTAGTGCCTCCCGCAAGGGGAGGCCCCCCTAGAACTCTTGTTCCCCCGTTCAGGTTCTTCT

AGGGAGTGGTGGCACTGCCGACGATCAATCAGCTCGTCCGAAAGGGCCGCGAGAAGGTCCGCAAAAAGAG
TCCCTCACCACCGTGACGGCTGCTAGTTAGTCGAGCAGGCTTTCCCGGCGCTCTTCCAGGCGTTTTTCTC
V V A L P T I N Q L V R K G R E K V R K K S

CAAGGTTCCGGCGCTGAAGGGGGCGCCCTTCCGCCGGGGGGTGTGCACCGTGGTGCGCACCGTCACCCCC
GTTCCAAGGCCGCGACTTCCCCCGCGGGAAGGCGGCCCCCCACACGTGGCACCACGCGTGGCAGTGGGGG
K V P A L K G A P F R R G V C T V V R T V T P

AAGA**G**GCCCAACTCGGCGCTCCGTAAGGTGGCC**G**AGGTGCGCCTCACCTCCGGCTACGAGGTGACCGCCT
TTCTCCGGGTTGAGCCGCGAGGCATTCCACCGGCTCCACGCGGAGTGGAGGCCGATGCTCCACTGGCGGA
K **R** P N S A L R K V A **E** V R L T S G Y E V T A Y

ACATCCCCGGCGAGGGGCACAACCTTCAGGAGCACTCGGTGGTCCTCATCCGGGGCGGCCGTGTGAAGGA
TGTAGGGGCCGCTCCCCGTGTTGGAAGTCCTCGTGAGCCACCAGGAGTAGGCCCCGCCGGCACACTTCCT
I P G E G H N L Q E H S V V L I R G G R V K D

CCTGCCGGGCGTGCGCTACCACATCGTGCGCGGGGTCTACGACGCCGCCGGGGTGAAGGACCGGAAGAAG
GGACGGCCCGCACGCGATGGTGTAGCACGCGCCCCAGATGCTGCGGCGGCCCCACTTCCTGGCCTTCTTC
L P G V R Y H I V R G V Y D A A G V K D R K K

AGCCGCTCCAAGTACGGGACCAAGAAGCCCAAGGAGGCGGCCAAGACCGCGGCCAAGAAG**TAG**GTGAGCT
TCGGCGAGGTTCATGCCCTGGTTCTTCGGGTTCCTCCGCCGGTTCTGGCGCCGGTTCTTCATCCACTCGA
S R S K Y G T K K P K E A A K T A A K K •

ATGGCACGGAGAAGGAGAGCAGAGGTCCGT**CATATG**
TACCGTGCCTCTTCCTCTCGTCTCCAGGCA**GTATAC**

FIGURA 6

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid

<120> Nuevo marcador de selección termoestable para la manipulación genética de *Thermus* spp.

<160> 8

<210> 1
<211> 135
<212> PROT
<213> *Thermus thermophilus*

<400> 1

```
Val Val Ala Leu Pro Thr Ile Asn Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg Glu
  1               5                  10                  15
Lys Val Arg Lys Lys Ser Lys Val Pro Ala Leu Lys Gly Ala Pro Phe
            20                  25                  30
Arg Arg Gly Val Cys Thr Val Val Arg Thr Val Thr Pro Lys Arg Pro
        35                  40                  45
Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Glu Val Arg Leu Thr Ser Gly Tyr
    50                  55                  60
Glu Val Thr Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His
65                  70                  75                  80
Ser Val Val Leu Ile Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val
                85                  90                  95
Arg Tyr His Ile Val Arg Gly Val Tyr Asp Ala Ala Gly Val Lys Asp
            100                 105                 110
Arg Lys Lys Ser Arg Ser Lys Tyr Gly Thr Lys Lys Pro Lys Glu Ala
        115                 120                 125
Ala Lys Thr Ala Ala Lys Lys
    130                 135
```

<210> 2
<211> 405
<212> ADN
<213> *Thermus thermophilus*

<400> 2

```
gtggtggcac tgccgacgat caatcagctc gtccgaaagg gccgcgagaa ggtccgcaaa 60
aagagcaagg ttccggcgct gaaggggcg cccttccgcc ggggggtgtg caccgtggtg 120
cgcaccgtca cccccaagag gcccaactcg gcgctccgta aggtggccga ggtgcgcctc 180
acctccggct acgaggtgac cgcctacatc cccggcgagg ggcacaacct tcaggagcac 240
tcggtggtcc tcatccgggg cggccgtgtg aaggacctgc cgggcgtgcg ctaccacatc 300
gtgcgcgggg tctacgacgc cgccggggtg aaggaccgga agaagagccg ctccaagtac 360
gggaccaaga agcccaagga ggcggccaag accgcggcca agaag                  405
```

<210> 3
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> cebador O-str1 diseñado para amplificar el gen rpsL

<400> 3

aaaacatatg tccaggccct cca 23

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> cebador O-str2 diseñado para amplificar el gen rpsL

<400> 4

aaaacatatg acggacctct gct 23

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> cebador O-repnde2d diseñado para amplificar la secuencia de ADN correspondiente al origen de replicación autónoma del vector pMK18.

<400> 5

ctgttcatat gcctcagttg a 21

<210> 6

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> cebador O-repnder diseñado para amplificar la secuencia de ADN correspondiente al origen de replicación autónoma del vector pMK18.

<400> 6

gggaccatat gcccctgga 19

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> cebador onarGNdeD diseñado para eliminar mediante PCR inversa el gen narC.

<400> 7

gcatatgcgg gactggatc 19

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> cebador OcitcNdeR diseñado para eliminar mediante PCR inversa el gen narC.

<400> 8

cgcatatgca cctccggccc ca 22

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 323 996

(21) Nº de solicitud: 200603279

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **27.12.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CARTER A.P. et al. Functional Insights from the Structure of the 30s Ribosomal Subunit and its Interactions with Antibiotics. Nature. Septiembre 2000. Vol. 407, páginas 340-348. Especialmente página 344, columna 2; página 345, columna 1.	1-19,22
A	GREGORY, S.T. et al. Streptomycin-resistant and Streptomycin-dependent Mutants of the Extreme Thermophile Thermus Thermophilus, J. Mol. Biol. 2001, Vol. 309, páginas 333-338.	1-19,22
A	CARR, J.F. et al. Effects of Streptomycin Resistance Mutations on Posttranslational Modification of Ribosomal Protein S12. Journal of Bacteriology. Marzo 2006, Vol. 188, No. 5, páginas 2020-2023.	1-19,22
A	BROUNS, S.J.J. et al. Engineering a Selectable Marker for Hyperthermophiles, The Journal of Biological Chemistry. Marzo 2005, Vol. 280, No. 12 páginas 11422-11431. Especialmente página 11423 y página 11430, columna 1, párrafo 5.	20
A	TAMAKOSHI, M. et al. An efficient Gene Replacement and Deletion System for an Extreme Thermophile, Thermus Thermophilus. FEMS Microbiology Letters. 1999, Vol. 173, páginas 431-437.	21
A	YAKHNIN, A.V. et al. Nucleotide Sequence of the Thermus Thermophilus HB8 rps12 and rps7 genes coding for the ribosomal proteins S12 and S7. Nucleic Acids research. 1990, Vol. 18, No. 12, página 3659.	1-19,22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
26.06.2009	N. Urquía Fernández	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)