(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 325**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **03750495 .8**
(96) Fecha de presentación : **08.09.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1539966**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

(54) Título: **Método de producción de proteínas.**

(30) Prioridad: **12.09.2002 EP 02020382**
11.07.2003 EP 03015881

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2010

(73) Titular/es: **Greenovation Biotech GmbH**
Botzingerstrasse 29B
79111 Freiburg, DE

(72) Inventor/es: **Gorr, Gilbert;**
Launhardt, Heike y
Berg, Birgit

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).

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

DESCRIPCIÓN

Método de producción de proteínas.

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a métodos y materiales para uso en la expresión de genes, y en particular para la producción de proteína extracelular no procedente de plantas, a partir de protoplastos de musgo.

Técnica anterior

Los sistemas de producción de proteínas recombinantes actualmente en uso abarcan desde sistemas procariotas tales como *Escherichia coli* y *Bacillus*, a sistemas eucariotas tales como levadura, células de mamífero, cultivos de células de insecto, animales transgénicos y plantas. Proteínas que tienen modificaciones posteriores a la traducción, v.g. glicosilación y procesamiento de puentes disulfuro, se producen típicamente en sistemas eucariotas. Para producción en gran escala de proteínas recombinantes se han utilizado típicamente líneas de células u organismos transformados de manera estable (es decir, sistemas en los cuales el ácido nucleico de interés se ha integrado en el genoma nuclear), así como sistemas de baculovirus/células de insecto. Por ejemplo, Schaefer *et al*. (1991) describen un método para la transformación estable de *Physcomitrella patens*, que comprende cultivar los protoplastos transformados en medio 3M durante 4 a 7 días antes de regenerar la planta. El establecimiento de dichas líneas de células u organismos transformados establemente es un proceso que consume mucho tiempo e intensivo en mano de obra.

La transfección de células de mamífero o células de insecto requiere muchas horas-hombre y el uso de equipo técnico especializado, v.g. cámaras de incubación con CO_2. Ambos factores hacen muy elevado el coste de producción.

Los sistemas de transformación transitoria basados en plantas que se utilizan para la expresión y producción transitoria de proteínas recombinantes están basados en la inoculación de tejidos de plantas o plantas enteras con agrobacterias o con partículas de virus (Vaquero *et al*. 1999; Fischer *et al*. 1999; Fischer y Emans 2000; Dirnberger *et al*. 2001). La transferencia directa de DNA en tejidos de plantas por bombardeo con partículas se ha utilizado también como método para testar la expresión génica antes de la transformación estable (Fischer *et al*. 1999).

Los sistemas alternativos de transformación transitoria, es decir, sistemas en los cuales el ácido nucleico de interés no está integrado en el genoma nuclear, ofrecen un camino hacia adelante para la expresión eficiente de proteínas heterólogas en cantidades comerciales.

Hasta ahora, la expresión transitoria de proteínas en protoplastos ha sido utilizada únicamente con sistemas informadores para v.g. análisis de promotores (Zeidler *et al*. 1999); análisis de transducción de señales; direccionamiento y circulación de proteínas; e interacción proteína-proteína (Sheen 2001). Se han utilizado ensayos de informadores en experimentos de transformación transitoria con protoplastos para el análisis de péptidos señal para la secreción de proteínas (v.g. De Loose *et al*. 1991, Denecke *et al*. 1990).

La secreción de proteínas recombinantes en el espacio extracelular (apoplasto) utilizando plantas transformadas de manera estable (esporofito) está perfectamente caracterizada (Magnuson *et al*. 1996, De Wilde *et al*. 1998) y a primera vista parecía ser una herramienta útil para producción de proteínas en plantas. La secreción de proteínas recombinantes expresadas en cepas transgénicas de musgo transformadas de manera estable (gametofito) directamente en el medio ha sido descrita también (WO 01/25456 A2).

Houba-Herin *et al*. (1999) describen la introducción de una citoquinina-oxidasa (CKO) de planta (maíz) en protoplastos de musgo en un sistema de ensayo transitorio y el análisis del papel de CKO en el desarrollo de la planta. La doctrina del documento describe la expresión de una citoquinina-oxidasa de planta (maíz) correctamente plegada y glicosilada, y no propone el protoplasto de musgo como posible sistema de producción de proteínas.

Sin embargo, la expresión y secreción transitorias de proteínas recombinantes no procedentes de plantas para producción de proteínas (suficiente para análisis de proteínas, v.g. modificaciones posteriores a la traducción, análisis MALDI-TOF) utilizando protoplastos de musgo transformados directamente por transferencia directa de DNA mediada por PEG no parece haber sido descrita en la técnica anterior.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que los protoplastos de musgo transformados transitoriamente (gametofitos) son capaces de expresar niveles altos de proteínas recombinantes no procedentes de plantas que se secretan al medio. Los protoplastos de musgo transformados transitoriamente pueden cultivarse en medios simples, que pueden comprender o no componentes que son adecuados para la estabilización de las proteínas. Adicionalmente, los protoplastos de musgo pueden concentrarse a una alta densidad de células, lo que permite que los mismos se transformen transitoriamente con relativa facilidad y en números elevados para uso en sistemas en los cuales pueden emplearse volúmenes pequeños de medio de cultivo, permitiendo la producción de soluciones concentradas de proteínas que facilitan los análisis ulteriores que requieren volúmenes pequeños pero concentraciones altas de proteína (v.g. modificaciones posteriores a la traducción).

Descripción de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para la producción transitoria de (una) o más proteínas extracelulares no procedentes de plantas en un protoplasto de musgo, método que comprende los pasos de transformar transitoriamente el protoplasto con un constructo de ácido nucleico que comprende (a) una o más secuencias heterólogas de nucleótidos que codifican dicha o dichas proteínas no procedentes de plantas enlazada(s) operativamente a un promotor, y cultivar el protoplasto transformado a fin de producir dicha o dichas proteínas no procedentes de plantas, en donde dicho cultivo tiene lugar durante al menos 48 horas en un medio de cultivo seleccionado del grupo constituido por W5, 3M y MMS.

Aspectos particulares de la invención se describirán a continuación con mayor detalle.

Definiciones

El término "heterólogo" se utiliza ampliamente más adelante para indicar que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión se ha (n) introducido transitoriamente en protoplastos de musgo utilizando ingeniería genética, v.g. por intervención humana. Una secuencia heteróloga de nucleótidos puede comprender la secuencia codificante de una proteína de fusión constituida por una pareja de fusión que puede estar formada, por ejemplo, en parte por una proteína de planta que puede estar fusionada a una proteína no procedente de plantas, lo que puede denominarse una proteína de fusión híbrida planta : no planta para los propósitos de la presente invención. Una proteína de fusión híbrida de este tipo puede considerarse también como una proteína no procedente de plantas para los propósitos de la presente invención. Alternativamente, una proteína de fusión puede ser una que está formada por parejas de fusión que no son de origen vegetal. Un gen heterólogo puede aumentar la expresión de una proteína de interés a partir de un gen endógeno equivalente, es decir uno que realiza normalmente la misma función o una función similar, o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. El ácido nucleico heterólogo a una célula puede ser no existente naturalmente en protoplastos de musgo de dicho tipo, variedad o especie. Así, el ácido nucleico heterólogo puede comprender una secuencia codificante de, o derivada de, un tipo particular de organismo, tal como una especie de mamífero, v.g. de especie humana, ovina, bovina, equina, o porcina, puesto en el contexto de un protoplasto del musgo, tal como un protoplasto derivado de *Physcomitrella patens*. Una proximidad adicional corresponde a una secuencia de ácido nucleico a situar dentro de un protoplasto de musgo en el cual se encuentra naturalmente la misma o un homólogo de la misma, pero en el cual la secuencia de ácido nucleico está enlazada y/o adyacente a un ácido nucleico que no existe naturalmente en la célula, o células de dicho tipo o especie o variedad de planta, por ejemplo enlazado operativamente a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia promotora, para control de la expresión.

El término "gen", a no ser que el contexto requiera otra cosa, se refiere a cualquier información genética que codifica un ácido nucleico no procedente de plantas para traducción en un péptido, polipéptido o proteína.

"Vector" se define de modo que incluye, entre otras cosas, cualquier vector de plásmido, cósmido, fago, o virus en forma lineal o circular bi- o monocatenaria a partir de la cual puede ser o no auto-transmisible o movilizable, y que puede transformar un hospedador procariota o eucariota y existe extracromosómicamente (v.g. plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Se incluyen específicamente vectores lanzadera por los cuales se entiende un vehículo de DNA capaz, naturalmente o por diseño, de replicación en dos organismos hospedadores diferentes, que pueden seleccionarse de actinomicetos y especies afines, bacterias y células eucariotas (v.g. plantas superiores, musgos, mamíferos, levaduras u hongos).

"Vector de expresión" se refiere a un vector en el cual un ácido nucleico se encuentra bajo el control de, y enlazado operativamente a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para transcripción en una célula hospedadora tal como una célula microbiana o un protoplasto de musgo. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional, que funciona en hospedadores múltiples. En el caso del DNA genómico o subgenómico, éste puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores, y en el caso del cDNA éste puede encontrarse bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para expresión en la célula hospedadora.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos a partir de la cual puede iniciarse la transcripción del DNA enlazado operativamente aguas abajo (es decir en la dirección 3' o en la cadena de sentido del DNA bicatenario).

"Enlazado operativamente" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, posicionada y orientada convenientemente para que se inicie la transcripción por el promotor.

El término "inducible", como se aplica a un promotor, está bien entendido por los expertos en la técnica. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible se pone en funcionamiento o se incrementa en respuesta a un estímulo aplicado. La naturaleza del estímulo varía entre los promotores. Algunos promotores inducibles causan niveles escasos o indetectables de expresión (o no causan expresión alguna) en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles causan expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión de cualquier promotor inducible se incrementa en presencia del estímulo correcto.

La invención abarca también el uso de una variante de cualquiera de estas secuencias. Una proteína variante comparte homología con, o es idéntica a, la totalidad o parte de las secuencias arriba descritas. Hablando en términos generales, cualquiera que sea el término que se utilice en esta memoria, las variantes pueden ser:

(i) variantes homólogas existentes naturalmente de la proteína relevante no procedente de plantas,

(ii) variantes homólogas generadas artificialmente (derivados) que pueden ser preparadas por la persona experta a la vista de la presente exposición, por ejemplo por mutagénesis orientada o aleatoria, o por síntesis directa. Preferiblemente, el ácido nucleico variante, que codifica el péptido variante, se genera directa o indirectamente (v.g. por uno o más pasos de amplificación o replicación) a partir de un ácido nucleico original. Los cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden producir un derivado por una o más operaciones de adición, inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, conduciendo a la adición, inserción, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. La mutación deseable puede ser mutagénesis aleatoria u orientada a fin de alterar la actividad (v.g. especificidad) o estabilidad del polipéptido codificado. Los cambios pueden tener lugar por variación conservadora, es decir sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Se incluyen también variantes que tienen sustituciones no conservadoras. En las regiones que son críticas en la determinación de la conformación o actividad de los péptidos, tales cambios pueden conferir propiedades ventajosas al polipéptido, v.g. estabilidad o especificidad alteradas.

La semejanza u homología en el caso de las variantes se establece preferiblemente por comparaciones de secuencia realizadas utilizando FASTA y FASTP (véase Pearson & Lipman, 1988. Methods in Enzymology 183: 63-98). Los parámetros se ajustan preferiblemente, utilizando la matriz por defecto, como sigue:

Gapopen (penalidad por el primer residuo en una laguna): -12 para proteínas/-16 para DNA

Gapext (penalidad por residuos adicionales en una laguna): -2 para proteínas/-4 para DNA

KTUP longitud de palabra: 2 para proteínas/6 para DNA.

La homología puede estar al nivel de la secuencia de nucleótidos y/o la secuencia de aminoácidos codificada. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico y/o de aminoácidos comparte al menos aproximadamente 75% u 80% de identidad, muy preferiblemente al menos aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad.

La homología puede evaluarse también por el uso de una metodología de sondas (Sambrook *et al*., 1989). Una fórmula común para calcular las condiciones de severidad requeridas para conseguir la hibridación entre moléculas de ácido nucleico de una homología de secuencia especificada es: T_m = 81,5ºC + 16,6 Log [Na+] + 0,41 (% G+C) - 0,63 (% formamida)-600/#pb en dúplex. Como ilustración de la fórmula anterior, utilizando [Na+] = [0,368] y 50% formamida, con contenido de GC de 42% y un tamaño medio de sonda de 200 bases, el valor T_m es 57ºC. El valor T_m de un dúplex de DNA decrece en 1-1,5ºC por cada 1% de disminución de la homología. Así, podrían observarse dianas con más de aproximadamente 75% de identidad de secuencia utilizando una temperatura de hibridación de 42ºC.

Uso en musgos

Como se describe más adelante, en sus diversos aspectos, la invención se empleará generalmente sobre protoplastos de musgo, utilizando ácidos nucleicos que codifican proteínas de interés no procedentes de plantas.

Promotores adecuados que operan en protoplastos de musgo incluyen el 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (35S de CaMV). Otros ejemplos se describen en pág. 120 de Lindsey & Jones (1989) Plant Biotechnology in Agriculture@Pub. OU Press, Milton Keynes, Reino Unido. El promotor puede seleccionarse de modo que incluya uno o más motivos o elementos de secuencia que confiere(n) control de la expresión experimental y/o regulador específico de tejido. Promotores inducibles de plantas incluyen el promotor inducido por etanol de Caddick *et al* (1998) Nature Biotechnology 16:177-180.

En caso deseado, pueden incluirse marcadores genéticos seleccionables en el constructo, tales como los que confieren fenotipos seleccionables tales como la resistencia a antibióticos o herbicidas (v.g. kanamicina, higromicina, fosfinotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato).

La presente invención proporciona también métodos que comprenden la introducción transitoria de tales constructos que comprenden secuencias heterólogas apropiadas en una célula de planta de musgo y/o la introducción de la expresión de un constructo en una célula de planta de musgo, por aplicación de un estímulo adecuado, v.g. un inductor exógeno eficaz. Células adecuadas de plantas de musgo incluyen el protoplasto de musgo, tales como los derivados de *Physcomitrella patens.*

El ácido nucleico puede introducirse en protoplastos de musgo utilizando cualquier tecnología adecuada, tal como la absorción de DNA mediada por PEG como se describe en esta memoria, bombardeo con partículas o microproyectiles (US 5100792, EP-A 444882, EP-A-434616), microinyección (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083,

EP 175966, Green *et al*. (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), electroporación (EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser), otras formas de absorción directa de DNA (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), absorción de DNA mediada por liposomas (v.g. Freeman *et al*. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de agitación vorticial (v.g. Kindle, PNAS EE.UU. 87: 1228 (1990d) Métodos físicos para la transformación de células de plantas han sido revisados en Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11.

Se prefieren electroporación, absorción de DNA mediada por PEG y absorción directa de DNA. Es especialmente preferido el procedimiento modificado de absorción de DNA mediada por PEG, como se describe en los ejemplos de esta memoria.

La elección particular de una tecnología de transformación estará determinada por su eficiencia para transformar ciertas especies de musgo, así como la experiencia y preferencia de la persona que practique la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para las personas expertas que la elección particular de un sistema de transformación transitoria para introducir ácido nucleico en protoplastos de musgo no es esencial para la invención. No obstante, se prefiere el uso del sistema de transformación de DNA mediada por PEG como se describe en esta memoria.

Así pues, diversos aspectos de la presente invención proporcionan un método de transformación transitoria de un protoplasto de musgo que implica la introducción de un constructo heterólogo basado en ácido nucleico como se describe más adelante en un protoplasto de musgo y causar o permitir la expresión transitoria del vector, lo que da a su vez como resultado la secreción de proteína extracelular en el medio. El cultivo de protoplastos de una manera muy concentrada da como resultado concentraciones de proteínas aumenta-das eficientemente.

En un prefermento (sic) se proporciona un método de transformación transitoria de un protoplasto de musgo por absorción de DNA mediada por PEG y cultivo del mismo *caracterizado porque* el cultivo se conduce en un volumen de cultivo de hasta 1000 μl. Preferiblemente, el cultivo se realiza en un volumen de cultivo de 50-1000 μl, más preferiblemente de 100-600 μl, más preferiblemente todavía de 100-300 μl y de modo muy preferible en aproximadamente 200 μl ± 50 μl.

Elección de los genes a mejorar

Genes de interés incluyen aquéllos que codifican proteínas de origen no vegetal que son en sí mismas, medicamentos naturales tales como productos farmacéuticos o veterinarios.

Los ácidos nucleicos heterólogos pueden codificar, *inter alia*, genes de origen bacteriano, fúngico, o no vegetal tales como proteínas de fusión como las citadas anteriormente en esta memoria, o de origen animal. Los polipéptidos producidos pueden utilizarse para producir polipéptidos que pueden purificarse a partir de ellos para uso en otro lugar. Proteínas que pueden producirse en un proceso de la invención incluyen heterodímeros, tales como FSH, inmunoglobulinas, anticuerpos de fusión y anticuerpos monocatenarios.

Tales proteínas incluyen, pero sin carácter limitante, la proteína del retinoblastoma, p53, angiostatina, y leptina. Análogamente, los métodos de la invención pueden utilizarse para producir proteínas reguladoras de mamífero. Otras secuencias de interés incluyen proteínas, hormonas, tales como hormona estimulante de los folículos, factores de crecimiento, citoquinas, seroalbúmina, hemoglobina, colágeno, taumatina, proteínas análogas a taumatina, factores de crecimiento epidérmico tales como VEGF, etc.

Expresión de genes diana

Hablando en términos generales, los ácidos nucleicos heterólogos pueden expresarse por cualquier proceso apropiado utilizado en la técnica o pueden transcribirse o expresarse como sigue:

(i) expresión transitoria de DNA “desnudo”, v.g. que comprende un promotor enlazado operativamente a la secuencia heteróloga de interés,

(ii) expresión a partir de un vector de expresión, tal como un vector de replicación. Hablando en términos generales, los expertos en la técnica son perfectamente capaces de construir vectores y diseñar protocolos para expresión transitoria de genes recombinantes. Pueden seleccionarse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, con inclusión de secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias intensificadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook *et al*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel *et al*. eds., John Wiley & Sons, 1992.

(iii) expresión de un vector no integrador que está presente al menos transitoriamente en el citoplasma.

Se entenderá que estas categorías no son mutuamente excluyentes, por ejemplo, dado que un vector no integrador puede ser también un vector de expresión, etc.

Métodos para conseguir dicha expresión se exponen en otro lugar de esta memoria.

Expresión transitoria incrementada a partir de vectores no integrados

Como se ha expuesto anteriormente, los autores de la presente invención han descubierto que la expresión incrementada de constructos introducidos (preferiblemente a niveles altos) en los protoplastos de un musgo, preferiblemente a densidad de células alta, tal como *Physcomitrella patens*, constructos que no están integrados en el genoma (v.g. ectópicamente) dan lugar a mRNA transcrito. Los constructos pueden introducirse en número de copias relativamente alto con promotores fuertes, y sin el efecto modelador inherente que puede ocurrir cuando se selecciona un transformante estable en el cual está integrado un constructo en el genoma. Como resultado, los niveles y concentraciones de proteína producidos pueden exceder con mucho de los que pueden alcanzarse por el uso de métodos para producción de proteínas en sistemas basados en células de plantas de la técnica anterior.

Así pues, en un aspecto de la invención, se describe el uso de un protoplasto de musgo transformado transitoriamente, capaz de generar mRNA que codifica una proteína diana generada por transcripción a partir de un constructo de ácido nucleico introducido transitoriamente, que incluye la secuencia nucleotídica diana enlazada operativamente a un promotor, constructo que se introduce en la célula de un organismo.

El "ácido nucleico introducido" incluirá así la secuencia de ácido nucleico heteróloga como una secuencia de DNA proporcionada en la forma de un constructo que es capaz de dar lugar a la producción de proteína extracelular a un nivel elevado con relación al nivel de producción de proteínas asociado normalmente con la expresión de transgenes estables de dicha secuencia de DNA. En un aspecto de la invención, la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar una proteína que está constituida por un péptido señal y/o un péptido de tránsito acoplado a la secuencia de proteína o polipéptido de elección.

Así pues, en un aspecto preferido de la invención, se describe un método para lograr la expresión transitoria de una secuencia de nucleótidos heteróloga en una planta, método que comprende el paso de introducir transitoriamente en un protoplasto de musgo al menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga no procedente de plantas.

En una realización, se proporciona un método de generar al menos una proteína heteróloga extracelular no procedente de planta, método que comprende los pasos de:

(i) introducir transitoriamente en un protoplasto de un musgo un primer ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga,

(ii) causar o permitir la expresión por el ácido nucleico, durante cierto periodo de tiempo, de la proteína heteróloga,

(iii) cosechar la proteína heteróloga secretada a partir del medio,

(iv) opcionalmente, aislar del medio los protoplastos de musgo.

Como resultado, los protoplastos de musgo pueden utilizarse para producir continuamente las proteínas deseadas después de cada cosecha de la proteína secretada.

El aislamiento puede hacerse por medios totalmente convencionales, y puede incorporar o no purificación parcial o completa.

Los protoplastos o tejidos de musgo comprenderán generalmente células gametofitos, tales como gametofitos del musgo *Physcomitrella patens*.

El periodo de tiempo para el cultivo de protoplastos de musgo puede ser cualquier periodo hasta o incluso más allá del periodo durante el cual el tejido se mantiene viable, o hasta que el mismo está saturado con proteína; en general, puede preferirse que el mismo sea entre aproximadamente 1 y 10 días, de modo más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 días.

Naturalmente, el experto en la técnica reconocerá que puede utilizarse más de un gen en el constructo o en cada constructo, aunque se prefiere una sola secuencia en cada caso. Vectores múltiples (cada uno de los cuales incluye una o más secuencias de nucleótidos que codifican la proteína heteróloga de elección) pueden introducirse en los protoplastos de musgo por métodos de absorción de DNA mediada por PEG como se describe en esta memoria. Esto puede ser útil para producir, v.g. subunidades múltiples, v.g. de una enzima.

Como se muestra en los ejemplos que siguen, la expresión transitoria de la secuencia heteróloga cuando se introduce de este modo puede proporcionar niveles muy altos de polipéptido diana durante el curso del periodo de expresión transitoria, que será generalmente de varios días, dependiendo de los métodos y materiales precisos empleados. Por utilización de los métodos de la invención como se describe en esta memoria, se consigue la secreción del polipéptido heterólogo en el medio.

Así pues, la expresión transitoria en el protoplasto de musgo representa una herramienta útil en muchos contextos para los cuales aquélla puede haberse considerado previamente inadecuada, v.g. la expresión fiable de secuencias de proteínas o polipéptidos heterólogas inestables, es decir expresadas transitoriamente, que se secretan al medio.

El método puede ser particularmente preferido en aquellas aplicaciones en las cuales se requieren niveles de expresión altos, pero en las cuales los constructos virales (con el requerimiento de "infección" de la planta) o plantas transgénicas estables son indeseables, v.g. donde es importante un ensayo rápido, o donde la secuencia en cuestión imparte un fenotipo letal.

El informador puede ser cualquier proteína detectable, tal como un gen marcador, utilizado comúnmente en la técnica tal como GUS, GFP, luciferasa, etc. Preferiblemente, el informador es un marcador no invasivo tal como GFP o luciferasa.

La invención se describirá a continuación con referencia a las figuras y ejemplos no limitantes siguientes. Otras realizaciones de la invención serán ideadas por los expertos en la técnica a la vista de éstos.

Ejemplos

Métodos y Materiales

Material de plantas

Se utilizó la cepa de tipo salvaje de *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. caracterizada previamente por Reski *et al*. 1994. Se trata de un subcultivo de la cepa 16/14 que fue recogida por H.L.K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire, Reino Unido fue propagada por Engel (1968).

Construcción de vectores

Construcción de pRT101 To32

Cribado por PCR para secuencias polinucleotídicas derivadas. Se cribó una biblioteca de cDNA de *Thuja occidentalis* con iniciadores degenerados para clones específicos por PCR. Para hacer esto, se diseñaron iniciadores 5' de acuerdo con la secuencia N-terminal obtenida por degradación de Edman (Edman y Begg G, 1967) de la proteína To32 endógena purificada, se derivaron los iniciadores 3' del motivo de consenso de proteínas semejantes a taumatina: se utilizaron 50 ng de la biblioteca de cDNA de *Thuja occidentalis* como molde en una PCR de lectura de pruebas Pfu (Promega, Alemania; condiciones de la PCR: 5 min, 94ºC; 30 ciclos: 30 s 94ºC/45 s 50ºC/90 s 72ºC; extensión: 10 min) utilizando el iniciador 5' To32N-2-S (5'-TTYGAYATIMGIAAYCARCAYGGNTAYAC-3') y el iniciador 3' Thaum-Mot-2-AS (5'-TCYTKIGSRTAGCTRTAVGCITSDGGRCA-3'). El producto PCR amplificado se purificó de acuerdo con procedimientos estándar (véase Sambrook y Russell, 2001). Se reamplificó 1 μl de producto PCR diluido en relación 1/100 en una PCR de lectura de pruebas Pfu "anidada" (Promega, Alemania; condiciones de la PCR: 5 min, 94ºC; 30 ciclos: 30 s 94ºC/45 s 50ºC/90 s 72ºC; extensión: 10 min) con iniciador 5' To32-N-3-S (5'-GCNGCIGGNYTNCCNGGIGGIGGNCA-3') y el iniciador 3' Thaum-Mot-1-AS (5'-CCRTCRAYIAIM GAIAYGTCSYAGAAATC-3'). Los productos PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) y se escindió y purificó del gel una banda de 263 pb (Quiagen, Hilden, Alemania). La banda se clonó en el vector pCR4-TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; libro de protocolo: versión H, 072701; 25-0276) para secuenciación. En detalle: A 4 μl de producto PCR purificado y adenilado (por extensión Taq-PCR; véase el protocolo) se añadió 1 μl de solución salina y 1 μl de vector TOPO. La reacción suavemente mezclada se incubó durante 5 min a la temperatura ambiente y se transformó luego en células Top10 quimiocompetentes (para el método, véase Sambrook y Russell, 2001). Los clones positivos se seleccionaron por extensión en placas LB, que contenían 50 μg/ml de kanamicina. El vector pCRTo resultante se secuenció y contenía un fragmento de 263 pb (pb 121-384 en CDS) del cDNA de To32. A partir de esta secuencia se derivaron un nuevo iniciador 5' To32-300-1-S (5'-GGCAGGGACAAAGAAGGC-3') y un nuevo iniciador 3' To32-300-2-AS (5'-AGTGTGCAGCTCAGTTGGC-3').

Para obtener la secuencia 5' ausente de To32, se realizó una PCR de lectura de pruebas *Pfu* (Promega, Alemania; condiciones de la PCR: 5 min, 94ºC; 30 ciclos: 30 s 94ºC/45 s 50ºC/90 s 72ºC; extensión: 10 min) con 50 ng de la biblioteca de cDNA de *Thuja occidentalis*, el iniciador 5' T7term (5'-CTAGTTATTGCTCAGCGG-3') y el iniciador 3' To32-300-2-AS (véase arriba). El producto PCR purificado se clonó en PCR4-TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; libro de protocolo: versión H, 072701; 25-0276) dando como resultado el vector pCRToN, y se secuenció. Este vector contiene los primeros 295 pb del To32-CDS (pb 1-295). Para obtener la secuencia ausente 3' de To32, se realizó una PCR de lectura de pruebas Pfu (Promega, Alemania; condiciones de la PCR: 5 min, 94ºC; 30 ciclos: 30 s 94ºC/45 s 50ºC/90 s 72ºC; extensión: 10 min) con 50 ng de la biblioteca de cDNA de *Thuja occidentalis*, el iniciador 5' To-32-300-1-S (véase arriba) y el iniciador 3' pYES-2-AS (5'-AAC-TAATTACATGATGCGGC-3'). El producto PCR purificado se clonó en PCR4-TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; libro de protocolo: versión H, 072701; 25-0276) dando como resultado el vector pCRToC, y se secuenció. Este vector contiene la región 3' del To32-CDS (pb 185-693). Las secuencias de cDNA para To32 se solaparon en vectores pCRTo, pCRToN y pCRToC. De este modo, pudo identificarse el CDS total

para To32, que comprendía 693 pb. Éste pudo modificarse por secuenciación de pETTo32 (véanse los procedimientos de clonación para To32 en pET24b(+) más adelante), que era 100% idéntico. En este caso, el CDS que codificaba la proteína nativa se amplificó de nuevo a partir de la biblioteca de cDNA de *Thuja occidentalis*.

NB para los iniciadores degenerados arriba descritos: R = G o A; Y = C o T; W = A o T; M = A o C; K = G o T; I = inosina; S = C o G; N = G, A, T o C.

Procedimientos de clonación para To32 en pET24b(+) (Novagen, Madison, WI, EE.UU.). La secuencia codificante de 615 pb de To32, que no comprendía la secuencia codificante para el péptido conductor de 26 aminoácidos, se amplificó a partir de la biblioteca de *Thuja occidentalis* por PCR de lectura de pruebas *Pfu* (Promega, Alemania) utilizando el iniciador de aguas arriba To32Nterm-BamH1-S (5'-CGG GAT CCA GTG AAG TTT AAT ATA CGG AAC C-3') y el iniciador de aguas abajo To32Cterm-EcoRI1-AS (5'-CGG AAT TCG GGC AGA ATA CGA TAC TGT AGT C-3'). Después de restricción del producto de amplificación resultante con EcoRI y *Bam*H1, se clonó el mismo en el vector de expresión procariota *pET24b (+)*, dando como resultado *pETTo32*.

Procedimientos de clonación para To32 en pGEX-4T-1. La secuencia de cDNA de 615 pb se amplificó a partir de *pETTo32*. Un producto PCR restringido con *Eco*RI/*Xho*I se clonó en *pGEX-4T-1*, utilizando los iniciadores P33 (5'-ATCGAATTCGTGAAGTTTAATATACGG-3') and P34 (5'-GTCCTCGAGTTAGGGGCAGAATACGATAC-3'), dando como resultado *pGEXTo32*.

Procedimientos de clonación para To32 en pKSTo32. Una secuencia de cDNA de 150 pb que codificaba el término N de To32 (con inclusión de la secuencia de 78 pb que codificaba el péptido de señal To32) se amplificó a partir de pCRToN utilizando los iniciadores P72 (5'-GTC GAA TTC ATG GCC ACA GTT TCA GAT C-3') y P74 (5'-AAG CAG CTG GAC CAG GGT CAG AC-3'). El producto PCR restringido con *Eco*RI/*Pvu*II se clonó en *pKs* (digerido con *Eco*RI/*Not*I), en una ligación de un solo tubo que incluía un fragmento de 546 pb digerido con *Pvu*II/*Not*I derivado de *pGEXTo32*, dando como resultado *pKSTo32*. *pKSTo32* contenía la secuencia de cDNA de la proteína To32 semejante a taumatina con inclusión de la secuencia codificante del péptido señal.

Procedimientos de clonación para To32 en pRT101To32. Se amplificó el cDNA de To32 a partir del plásmido pKsTo32 utilizando los iniciadores MoB254 (5'-ATA CTC GAG GAA GAT GGC CAC AGT TTC-3') y P73 (5'-GTC GGA TCC TTA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC GGG GCA GAA TAC GAT ACT G-3') por PCR de lectura de pruebas Pfu (Promega, Alemania; condiciones de la PCR: 2 min, 94ºC; 25 ciclos: 30 s 94ºC/30 s 54ºC/2 min 72ºC; extensión: 10 min). Después de restricción del producto de amplificación resultante con *Xho*I y *Bam*HI se clonó el mismo en pRT101 (Töpfer *et al*. 1987; digerido con *Xho*I/*Bam*HI). El plásmido resultante contenía el cDNA de To32 (con inclusión de secuencias codificantes del péptido señal de To32 y el epítope FLAG C-terminal) (posicionado aguas abajo del promotor 35S de CaMV y terminado por el terminador CaMV. Este plásmido se designó pRT101To32.

Construcción de pRT101VEGF C3

El cDNA del factor de crecimiento endotelial vascular humano 121 ($VEGF_{121}$) sin la secuencia conductora se escindió como un fragmento *Nde*I-*Sal*I a partir de pCYTEXP-$VEGF_{121}$ (proporcionado amablemente por el Dr. McCarthy, GBF, Braunschweig, Alemania). Este fragmento se hizo romo por la reacción de Klenow y se introdujo en pRT101 (Töpfer *et al*. 1987) en el sitio de restricción *Sma*I para formar el plásmido pRT101VEGF C3. En este constructo, se dispuso el cDNA de $VEGF_{121}$ sin la secuencia conductora aguas abajo del promotor 35S de CaMV y se terminó por medio del terminador CaMV (Gorr, 1999).

Construcción de pRT101TPVEGF C3

La secuencia para el péptido señal VEGF (señal de clasificación para la secreción) se clonó en pRT101VEGF C3. Se amplificó el cDNA del péptido señal a partir del plásmido pRT101 P21 (Gorr, 1999) utilizando el iniciador 5' MoB323 5'-ATA CTC GAG GAA GAT GAA CTT TTC TGC CTG TCT TGG-3') que contenía un sitio de restricción *Xho*I y el iniciador 3' MoB349 5'-CTG CCA TGG GTG CAG CCT GGG ACC AC-3' que contenía el sitio de restricción *Nco*I. El DNA amplificado se digirió con *Xho*I y *Nco*I y ligó en pRT101VEGF C3 (digerido con *Xho*I/*Nco*I) dando como resultado pRT101TPVEGF C3. El plásmido resultante contenía las secuencias codificantes para péptido el señal VEGF y $VEGF_{121}$ en marco bajo control del promotor 35S de CaMV.

Construcción de pRT101TPVEGF-1 C3

La secuencia para el péptido señal VEGF (señal de clasificación para la secreción) sin los tres nucleótidos del terminal 3' (que causaban una deleción del último aminoácidos (término C) del péptido de tránsito) se clonó en pRT101VEGF C3. El cDNA del péptido señal se amplificó a partir del plásmido pRT101 P21 (Gorr, 1999) utilizando el iniciador 5' MoB323 5'-ATA CTC GAG GAA GAT GAA CTT TTC TGC CTG TCT TGG-3' que contenía un sitio de restricción *Xho*I y el iniciador 3' MoB350 5'-CTG CCA TGG GTG CAG CCT GGG ACC ACT TGG-3' que contenía el sitio de restricción *Nco*I y la deleción 3'. El DNA amplificado se digirió con *Xho*I y *Nco*I y se ligó en pRT101VEGF C3 (digerido con *Xho*I/*Nco*I) dando como resultado pRT101TPVEGF-1 C3. El plásmido resultante contenía las secuencias codificantes para el péptido señal VEGF con inclusión de la deleción 3' y $VEGF_{121}$ en marco bajo control del promotor 35S de CaMV.

Construcción de pRT101TPTo32 C3

La secuencia para el péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina (señal de clasificación para la secreción) se clonó en pRT101VEGF C3. El cDNA del péptido señal se amplificó a partir del plásmido pCRToN (pTo63) utilizando el iniciador 5' MoB254 5'-ATA CTC GAG GAA GAT GGC CAC AGT TTC AGA TC-3' que contenía un sitio de restricción *Xho*I y el iniciador 3' MoB250 5'-CTG CCA TGG GTG CTG CTC CCG CCT CT-3' que contenía el sitio de restricción *Nco*I. El DNA amplificado se digirió con *Xho*I y *Nco*I y se ligó a pRT101VEGF C3 (digerido con *Xho*I/*Nco*I) dando como resultado pRT101TPTo32 C3. El plásmido resultante contenía las secuencias codificantes del péptido señal To32 y $VEGF_{121}$ en marco bajo control del promotor 35S de CaMV.

Construcción de pRT101TPTo32-1 C3

La secuencia para el péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina (señal de clasificación para la secreción) sin los tres nucleótidos del terminal 3' (que causaban una deleción del último aminoácido (término C) del péptido de tránsito) se clonó en pRT101VEGF C3. El cDNA del péptido señal se amplificó a partir del plásmido pCRToN (pTo63) utilizando el iniciador 5' MoB254 5'-ATA CTC GAG GAA GAT GGC CAC AGT TTC AGA TC-3' que contenía un sitio de restricción *Xho*I y el iniciador 3' MoB324 5'-CTG CCA TGG GTG CTC CCG CCT CTT GG-3' que contenía el sitio de restricción *Nco*I. El DNA amplificado se digirió con *Xho*I y *Nco*I y se ligó en pRT101VEGF C3 (digerido con *Xho*I/*Nco*I) dando como resultado pRT101TPTo32-1 C3. El plásmido resultante contenía las secuencias codificantes para el péptido señal To32 con inclusión de la deleción 3' y $VEGF_{121}$ en marco bajo control del promotor 35S de CaMV.

Construcción de pRT99TPftszGFP

La casete de expresión para GFP que contenía el fragmento de cDNA de 297 pb ftsZ1 codificante del péptido de tránsito de cloroplasto FtsZ1 y cDNA para *gfp* bajo control del promotor 35S de CaMV y el terminador nos se escindió como un fragmento *Hind*III/*Eco*RI a partir de pFtsZ1 (1-93)-GFP (Kiessling *et al*. 2000). El fragmento se ligó a pRT99 (digerido con *Hind*III/*Eco*RI) dando como resultado pRT99TPftszGFP.

Condiciones estándar de cultivo

Se cultivaron plantas axénicamente en condiciones estériles en medio Knop ordinario modificado con líquido inorgánico (1000 mg/l $Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$, 250 mg/l KCl, 250 mg/l KH_2PO_4, 250 mg/l $MgSO_4$ x $7H_2O$ y 12,5 mg/l $FeSO_4$ x $7H_2O$; pH 5,8 (Reski y Abel 1985)). Las plantas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 200 ml de medio de cultivo y los matraces se sacudieron en una máquina de sacudidas Certomat R (B. Braun Biotech International, Alemania) ajustada a 120 rpm. Las condiciones en la cámara de cultivo eran 25 ± 3ºC y un régimen luz-oscuridad de 16:8 h. Los matraces se iluminaron desde arriba con dos tubos fluorescentes (Osram L58W/25) que proporcionaban 35 μmol^{-1} m^{-2}. Los cultivos se subcultivaron una vez a la semana por desintegración utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Alemania) e inoculación de dos nuevos matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio Knop nuevo.

Aislamiento de los protoplastos

Precultivo de tejido de musgo para aislamiento óptimo de protoplastos. Los musgos (especialmente *Physcomitrella patens*) pueden precultivarse en condiciones diferentes a fin de obtener rendimientos óptimos de protoplastos:

I. Rother *et al*. 1994, cultivaron tejido de musgo durante 7 días en medio Knop con contenido reducido (10%) de $Ca(NO_3)_2$. Los cultivos se filtraron 3 ó 4 días después de la desintegración y se transfirieron a medio Knop nuevo con contenido reducido (10%) de $Ca(NO_3)_2$.

II. En lugar de la reducción del $Ca(NO_3)_2$, el medio para precultivo puede complementarse con tartrato de amonio 5 mM, o el pH puede cambiarse a 4,5 (en cultivos líquidos con valores de pH incontrolados se alcanza un valor medio de pH de 5,8 para el medio Knop modificado). Los cultivos se filtraron 3 ó 4 días después de la desagregación del tejido y se transfirieron a medio Knop nuevo modificado (complementado con tartrato de amonio 5 mM o cambiado a pH 4,5).

III. Hohe y Reski (2002) optimizaron las condiciones de cultivo en un biorreactor semicontinuo para obtener rendimientos altos de protoplastos. Se obtuvieron protoplastos de rendimientos altos aislados por suplementación del medio Knop modificado (Reski y Abel 1985) con 460 mg/l de tartrato de amonio o a valores de pH controlados con un punto de ajuste de 4,5 (en los cultivos de biorreactor con valores de pH incontrolados se alcanza un pH medio de 5,8 para el medio Knop modificado).

Protocolos diferentes para el aislamiento de protoplastos (Grimsley *et al*. 1977; Schaefer *et al*. 1991; Rother *et al*. 1994; Zeidler *et al*. 1999; Hohe y Reski 2002, Protocol Schaefer 2001) y para transformación (Schaefer *et al*. 1991; Reutter y Reski 1996, Protocol Schaefer 2001) han sido descritos para *Physcomitrella patens.*

Para el trabajo presentado en esta memoria, se utilizó una modificación/combinación de los métodos descritos anteriormente:

Después de filtración, se preincubaron los protonemas de musgo en manitol 0,5 M. Después de 30 min, se añadió a la suspensión 4% de Driselasa (Sigma, Deisenhofen, Alemania). La Driselasa se disolvió en manitol 0,5 M (pH 5,6-5,8), se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min y se esterilizó por paso a través de un filtro de 0,22 μm (Millex GP, Millipore Corporation, EE.UU.). La suspensión, que contenía 1% de Driselasa (concentración final) se incubó en la oscuridad a TA y se agitó suavemente (los rendimientos óptimos de protoplastos se alcanzaron después de 2 horas de incubación) (Protocolo Schaefer 2001). La suspensión se pasó a través de tamices (Wilson, CLF, Alemania) con tamaños de poro de 100 μm y 50 μm. La suspensión se centrifugó en tubos de centrífuga estériles y los protoplastos se sedimentaron a TA durante 10 min a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; multicentrífuga 3 S-R, Kendro, Alemania) (Protocolo Schaefer 2001). Los protoplastos se resuspendieron suavemente en medio W5 ($CaCl_2$ x $2H_2O$ 125 mM; NaCl 137 mM; glucosa 5,5 mM; KCl 10 mM; pH 5,6; 660-680 mOsm; filtrado en condiciones estériles). La suspensión se centrifugó de nuevo a TA durante 10 min a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; multicentrífuga 3 S-R, Kendro, Alemania) (modificación, observación: Schaefer *et al*. 1991 mencionaron que el medio W5 daba como resultado una viabilidad reducida). Los protoplastos se resuspendieron suavemente en medio W5 (Rother *et al*. 1994). Para recuento de los protoplastos se transfirió un pequeño volumen de la suspensión a una cámara Fuchs-Rosenthal.

Protocolo de transformación

Para la transformación, se incubaron los protoplastos en hielo a la oscuridad durante 30 minutos. Subsiguientemente, los protoplastos se sedimentaron por centrifugación a TA durante 10 min a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; multicentrífuga 3 S-R, Kendro). Los protoplastos se resuspendieron en medio 3M ($CaCl_2$ x $2H_2O$ 15 mM; 0,1% MES; manitol 0,48 M; pH 5,6; 540 mOsm; filtrado en condiciones estériles, Schaefer *et al*. 1991) a una concentración de 1,2 x 10^6 protoplastos/ml (Reutter y Reski 1996). Se dispensaron 250 μl de esta suspensión de protoplastos en un tubo estéril nuevo de centrífuga, 50 μl de solución de DNA (DNA purificado en columna en H_2O (Qiagen, Hilden, Alemania); 10-100 μl; cantidad óptima de DNA de 60 μg) y se añadieron finalmente 250 μl de solución de PEG (40% PEG 4000; manitol 0,4 M; $Ca(NO_3)_2$ 0,1 M; pH 6 después de tratamiento en autoclave). La suspensión se mezcló inmediata pero suavemente y se incubó luego durante 6 min a TA con mezcladura suave ocasional. La suspensión se diluyó progresivamente por adición de 1, 2, 3 y 4 ml de medio 3M. La suspensión se centrifugó a 20ºC durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; multicentrífuga 3 S-R, Kendro). El pelet se resuspendió en 300 μl o 400 μl de medio (para ejemplos: medio 3M o medio W5 o medio MMS (que contenía 610 mg $MgCl_2$ x $6H_2O$; 0,2 g MES; 18,21 g D-sorbita (Roth, Alemania), pH 5,6-5,8; 191 mOsm). El cultivo de los protoplastos transformados se realizó en placas de 96 pocillos (300 μl, Nunclon, Nunc GmbH, Wiesbaden, Alemania) o placas de 48 pocillos (400 μl, Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania).

Las muestras de transformación transitoria se incubaron en luz débil (4,6 $\mu mols^{-1}\ m^{-2}$) a 25ºC.

Toma de muestras

Se reemplazó cuidadosamente el medio (a fin de evitar la dispersión de los protoplastos) por medio nuevo cada 24 h. El medio no se reemplazó completamente, dado que los protoplastos tienen que mantenerse en líquido. El medio retirado (con inclusión de la proteína recombinante) se guardó a -20ºC.

Se realizaron experimentos de evolución temporal reemplazando la mitad del medio (se retiraron 200 μl, y se añadieron 200 μl de medio nuevo).

En algunos experimentos, tanto los protoplastos como el medio se aislaron después de las segundas 24 h.

Las muestras se guardaron a -20ºC.

Ensayos

Cuantificación de $VEGF_{121}$ recombinante

El $VEGF_{121}$ recombinante expresado por los protoplastos de musgo transitorios transformados se cuantificó por ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyeron para cuantificación.

Determinación de la actividad biológica de $VEGF_{121}$ recombinante. La actividad biológica de $VEGF_{121}$ recombinante expresada por los protoplastos de musgo transformados transitoriamente se determinó por RELIDA específico de VEGF (RELIATech, Braunschweig, Alemania). El RELIDA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo reconoce únicamente formas libres, no complejadas y biológicamente activas de VEGF-A que no están secuestradas por receptores solubles. Las moléculas de VEGF-A secuestradas, monómeras y degradadas no serán detectadas (instrucciones del fabricante).

Análisis por transferencia Western

La expresión de proteínas se realizó por análisis mediante transferencia Western. Las muestras se mezclaron con tampón de muestras reductor o no reductor y se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% o 15% de acuerdo con Laemmli (1970). Para la Transferencia Western, las proteínas se sometieron a electrotransferencia desde SDS-PAGE por transferencia semiseca a una Membrana NC Optitran BA-S83 Reforzada (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) de acuerdo con Towbin (1979) utilizando un dispositivo Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania). El análisis se llevó a cabo utilizando el sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La detección de $VEGF_{121}$ se realizó en condiciones no reductoras. Las muestras se calentaron durante 10 min a 60ºC antes de la carga. El VEGF recombinante se detectó utilizando anticuerpo anti-rhVEGF (AF-293-NA, R&D Systems, Wiesbaden, Alemania), diluido en relación 1/500 en solución salina tamponada con Tris, pH 8/0,05% Tween 20 y una IgG anti-cabra, marcada con peroxidasa (A5420, Sigma, Taufkirchen, Alemania) diluida en relación 1/8000 en solución salina tamponada con Tris, pH 8/0,05% Tween 20.

La detección de la proteína To32 semejante a taumatina se realizó en condiciones reductoras. Las muestras se calentaron durante 10 min a 95ºC antes de la carga. Se detectó To32 recombinante utilizando conjugado anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2-peroxidasa (A-8592, Sigma, Deisenhofen, Alemania), diluido en relación 1/1000 en solución salina tamponada con Tris, pH 8/0,05% Tween 20.

Microscopía

Se analizaron tejidos de plantas utilizando un Axiovert 200 (Zeiss, Alemania). La fluorescencia de GFP se visualizó utilizando la serie de filtros 10 (excitación: 450-490 nm; emisión: 515-565 nm; Zeiss, Alemania). Las sustancias de la pared celular se tiñeron con 5 μg/ml de Abrillantador Fluorescente 28 (específico de celulosa, Sigma, Deisenhofen, Alemania) o Azul de Anilina al 0,01% (específico de callosa, Merck, Darmstadt, Alemania) y la regeneración de las paredes celulares se analizó utilizando la serie de filtros 2 (excitación: G 365 nm, emisión: LP 420 nm, Zeiss, Alemania).

Resultados

Viabilidad

La viabilidad de los protoplastos de musgo aislados 48 horas después de la transformación era aproximadamente 50%. La viabilidad se calculó por recuento de los protoplastos supervivientes microscópicamente en una cámara Fuchs-Rosenthal. Schaefer (protocolo 2001) mencionaba una tasa de regeneración de 50%.

Tasa de transformación

Estimada por expresión de GFP de los protoplastos transformados transitoriamente. Se transformaron 5 a 10% de los protoplastos viables. La transformación se realizó con 60 μg de DNA. La relación de protoplastos transformados a protoplastos supervivientes se calculó sometiendo a recuento los protoplastos supervivientes y que expresaban GFP microscópicamente en una cámara Fuchs-Rosenthal. Schaefer (protocolo 2001) mencionaba una tasa de transformación de protoplastos supervivientes de 5 a 25%.

Regeneración de protoplastos

Los protoplastos pudieron cultivarse en medio 3M o en medio W5 durante 2 a 3 meses. Cultivados en medio 3M o W5, los protoplastos no eran capaces de regenerar las paredes celulares o de dividirse. Sin embargo, la transferencia de protoplastos de 3 meses de vejez en medio de regeneración daba como resultado una regeneración más lenta pero aparentemente normal. La regeneración de las paredes celulares se verificó utilizando tintes específicos contra Callosa (Azul de Anilina) y celulosa (Abrillantador Fluorescente 28) y se visualizó por microscopía.

Secreción

Se realizaron experimentos de deleción a fin de analizar la escisión apropiada de los péptidos señal y la secreción direccionada. Se delecionaron los aminoácidos terminales de los péptidos señal que representaban los sitios de escisión.

Ejemplo 1

Péptido Señal VEGF Humano

La secuencia codificante del péptido señal de VEGF humano se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB323/MoB349; molde: pRT101 P21 (Gorr, 1999)) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3 (Gorr 1999). El plásmido pRT101TPVEGF C3 resultante se utilizó para experimentos transitorios de transformación.

La secuencia codificante del péptido señal de VEGF humano, que no comprendía los tres nucleótidos (5'-CAG-3') codificantes del aminoácido C-terminal (Gln) se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB323/MoB350) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3. El plásmido pRT101TPVEGF-1 C3 resultante se utilizó asimismo para experimentos de transformación transitoria.

Se utilizaron para la transformación 60 μg de DNA (purificado en columnas Qiagen, Alemania) de cada constructo. Se realizaron 3 experimentos de transformación en paralelo para cada constructo. Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 48 h en placas de 48 pocillos en condiciones de luz débil (16 h luz, 8 h oscuridad). 24 horas después de la transformación, se reemplazó la mitad del medio por medio nuevo. La toma de muestras se realizó 48 h después de la transformación por retirada de 200 μl. El $VEGF_{121}$ direccionado al medio por el péptido señal nativo dio como resultado 8,47 ng/ml ± 1,95 y se ajustó a 100%. La deleción del último aminoácido del péptido señal dio como resultado una secreción reducida de 0,21 ng/ml ± 0,06, o respectivamente 2,48% (Tab. 1).

Ejemplo 2

Péptido Señal To32 de la Proteína Semejante a Taumatina de Plantas

La secuencia codificante del péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina de plantas se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB254/MoB250; molde pCRToN) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3 (Gorr, 1999). El plásmido pRT101TPTo32 C3 resultante se utilizó para experimentos de transformación transitoria.

La secuencia codificante del péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina de plantas, que no incluía los tres nucleótidos (CTG) codificantes del aminoácido C-terminal (Leu) se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB254/MoB324) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3. El plásmido pRT101TPTo32-1 C3 resultante se utilizó para experimentos de transformación transitoria.

Se utilizaron para la transformación 60 μg de DNA (purificado en columnas, Qiagen, Alemania) de cada constructo. Se realizaron en paralelo 3 experimentos de transformación para cada constructo. Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 48 h en placas de 48 pocillos en condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). 24 h después de la transformación, la mitad del medio se reemplazó por medio nuevo. La toma de muestras se realizó 48 h después de la transformación retirando 200 μl. El VEGF121 direccionado al medio por el péptido señal nativo producía 26,83 ng/ml ± 6,25 y se fijó como 100%. La deleción del último aminoácido del péptido señal dio como resultado una secreción reducida de 2,18 ng/ml ± 0,67 o respectivamente 8,13% (Tab. 1).

Comparación de los diferentes péptidos señal en ensayos de expresión transitoria

Se investigó si el uso de los péptidos señal distintos del péptido señal nativo da o no como resultado una secreción mejorada de proteínas recombinantes. Se comparó el péptido señal nativo de VEGF con el péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina.

La secuencia codificante del péptido señal de VEGF humano se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB/MoB; molde: pRT101 P21 (Gorr, 1999)) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3 (Gorr 1999). Se utilizó el plásmido pRT101TPVEGF C3 resultante para los experimentos de transformación transitoria. La secuencia codificante del péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB/MoB; molde: pCRToN) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3 (Gorr 1999). El plásmido pRT101TPTo32 C3 resultante se utilizó para experimentos de transformación transitoria.

Se utilizaron para la transformación 60 μg de DNA (purificado en columnas, Qiagen, Alemania) en cada constructo. Se realizaron 3 experimentos de transformación en paralelo para cada constructo. Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 48 h en placas de 48 pocillos en condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). 24 h después de la transformación, se reemplazó la mitad del medio por medio nuevo. La toma de muestras se realizó 48 h después de la transformación por retirada de 200 μl. El VEGF121 direccionado al medio por el péptido señal To32 de la proteína semejante a taumatina de plantas dio como resultado rendimientos 3 veces mayores (123,3 ng/ml ± 11,1) comparado con el direccionamiento por el péptido señal de VEGF (41,7 ng/ml ± 6,9).

La secreción de la proteína recombinante se incrementó utilizando el péptido señal no nativo (Tab. 2).

Experimentos a lo largo del tiempo utilizando diferentes medios

La secuencia codificante del péptido señal VEGF humano se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (MoB/MoB; molde: pRT101 P21 (Gorr 1999)) y se introdujo en marco para *vegf*121 en pRT101 C3 (Gorr 1999). El plásmido pRT101TPVEGF C3 resultante se utilizó para los experimentos de transformación transitoria.

Se utilizaron para la transformación 60 μg de DNA (purificado por Qiagen Midiprep) de pRT101TPVEGF C3. Se realizaron tres experimentos de transformación en paralelo para cada condición de cultivo. Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M o medio W5 o medio MMS durante 96 h en placas de 48 pocillos utilizando condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). La toma de muestras se realizó reemplazando la mitad del medio (200 μl) por medio nuevo cada 24 h. Las tasas de secreción se calcularon como sigue:

rendimiento de proteína después de 24 h = tasa de secreción 0-24 h (24 h);

rendimiento de proteína después de 48 h - (rendimiento de proteína después de 24 h/2) = tasa de secreción 24-48 h (48 h);

rendimiento de proteína después de 72 h - (rendimiento de proteína después de 48 h/2) = tasa de secreción 48-72 h (72 h);

rendimiento de proteína después de 96 h - (rendimiento de proteína después de 72 h/2) = tasa de secreción 72-96 h (96 h);

tasas de secreción 0-24 h + 24-48 h + 48-72 h + 72-96 h = tasa de secreción 0-96 h (0-96 h).

Las evoluciones temporales para la secreción eran ligeramente diferentes en los medios testados. La expresión transitoria realizada en medio W5 (24 h:6,25 ng/ml) y medio MMS (24 h = 5,12 ng/ml) comenzaron más pronto comparadas con la tasa de secreción durante 0-24 h en medio 3M (24 h = 1,72 ng/ml). Sin embargo, pudieron observarse más o menos las mismas tasas de secreción en medio 3M entre 24 y 96 h (48 h = 5,85 ng/ml; 72 h = 4,48 ng/ml; 96 h 4,3 ng/ml). En contraste, se midieron tasas de secreción menores entre 72 y 96 h en las muestras de transformación transitoria realizadas en medio W5 (48 h = 7,05 ng/ml; 72 h: 5,05 ng/ml; 96 h: 2,43 ng/ml) y medio MMS (48 h = 4,54 ng/ml; 72 h = 4,68 ng/ml; 96 h = 0,86 ng/ml (Tab. 3).

El cálculo de las tasas de secreción a lo largo del periodo total de 96 h (0-96 h) dio como resultado rendimientos máximos para medio W5 (20,77 ng/ml, seguido por medio 3M (16,35 ng/ml) y medio MMS (15,2 ng/ml) (Tab. 3). El uso de medios diferentes para la transformación transitoria de protoplastos daba como resultado evoluciones temporales diferentes de secreción a lo largo de 96 h. En contraste, los rendimientos totales de proteína recombinante excretada después de 96 h eran sólo ligeramente diferentes.

Rendimientos de proteínas muy concentradas

Se utilizaron para cada transformación 60 μg de DNA del constructo (pRT101TPTo32 C3 purificado por Qiagen Midiprep). Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 72 h en placas de 96 pocillos en condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). El medio se reemplazó por medio nuevo 24 h después de la transformación. Los sobrenadantes (150 μl/muestra de transformación) se recogieron 48 h después de la transformación, se añadió medio 3M nuevo y 72 h después de la transformación se recogieron nuevamente los sobrenadantes. La incubación de los protoplastos en un volumen tan pequeño dio como resultado 130 ng/ml (valor medio: 2 pg/célula) de $VEGF_{121}$ recombinante excretado durante 24 h.

Dimerización de $VEGF_{121}$ en protoplastos de musgo

En las células de mamífero, $VEGF_{121}$ se sintetiza como una proteína precursora y después de la eliminación del péptido señal se procesa el mismo en un homodímero enlazado con disulfuro de 34-36 kDa. En este caso, se utilizó el péptido conductor de VEGF y el péptido conductor To32 de la proteína semejante a taumatina para evaluar adecuadamente la dimerización enlazada por disulfuro y secreción de $VEGF_{121}$ expresada en los protoplastos de musgo transformados transitoriamente. La proteína excretada se realizó en ensayos de transferencia Western en condiciones no reductoras. Se utilizaron 60 μg de DNA de los constructos (pRT101TPVEGF C3 y pRT101TPTo32 C3).

Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 72 h en placas de 96 pocillos y condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). 24 h después de la transformación se reemplazó el medio por medio nuevo. Los sobrenadantes se recogieron 48 h después de la transformación, se añadió medio 3M nuevo y 72 h después de la transformación se recogieron de nuevo los sobrenadantes.

En condiciones no reductoras, el anticuerpo detectaba una banda de 35 kDa. Esto sugiere que los monómeros se dimerizaban adecuadamente y se secretaban eficientemente. Se utilizó como control $VEGF_{121}$ recombinante derivado de *E. coli* (replegado a la estructura nativa, R&D Systems, Alemania).

Determinación cuantitativa de $VEGF_{121}$ recombinante biológicamente activo expresado por musgo

La actividad biológica se determinó por tecnología RELIDA (RELIATech, Braunschweig, Alemania). El kit RELIDA está basado en receptores solubles de VEGF-A como moléculas de captura de ligandos activos. El receptor reconoce únicamente las formas libres, no complejadas y biológicamente activas de VEGF-A (que incluyen $VEGF_{121}$). Comparado con los resultados de ELISA, se midieron las mismas cantidades de $VEGF_{121}$ con RELIDA. Basándose en este resultado, el $VEGF_{121}$ recombinante excretado parece tener actividad biológica completa.

Proteína To32 semejante a taumatina

La proteína To32 semejante a taumatina exhibía capacidad de fijación de CD4. Para propósitos analíticos, eran necesarias cantidades de microgramos. Se utilizó la transformación transitoria arriba descrita de protoplastos de musgo para la producción de To32 recombinante excretada.

La expresión transitoria de la proteína To32 semejante a taumatina se realizó en medio 3M. Los protoplastos se aislaron de cultivos en biorreactor (pH 4,5). Se utilizaron para cada transformación 60 μg de DNA (pRT101To32). Las muestras de transformación se cultivaron en medio 3M durante 96 h en placas de 96 pocillos en condiciones de luz débil (16 h luz : 8 h oscuridad). Se recogieron los sobrenadantes (150 μl) 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la transformación. Los sobrenadantes recogidos se reemplazaron siempre por volúmenes idénticos de medio nuevo. Durante las primeras 24 h, no se excretó al medio cantidad alguna de To32 recombinante. Después de las primeras 24 h, se excretaron continuamente al medio rendimientos altos de To32 recombinante (24-48 h = 2,5 μg (valor medio: 37,5 pg/célula); 48-72 h = 5 μg (valor medio: 75 pg/célula); 72-96 h = 3,75 μg (valor medio: 56,2 pg/célula; valor medio). Se utilizó To32 derivada de *E. coli* para cuantificación de los análisis de transferencia Western.

Con la transformación transitoria en protoplastos de musgo, se alcanzaron rendimientos de proteína recombinante excretada hasta 5 μg/ml durante 24 h para una proteína semejante a taumatina (To32) que tenía capacidad de fijación de CD4.

Comparación con otros sistemas

Fiebich *et al*. (1993) describieron la expresión recombinante y secreción de VEGF en células de insecto infectadas con baculovirus. Dichos autores alcanzaron niveles de 3-5 μg VEGF/ml por 2-4 x 10^6 células (valor medio por célula: 1,33 pg). En protoplastos de musgo transformados transitoriamente se alcanzaron niveles de secreción de 130 ng VEGF/ml por 6,6 x 10^4 células (valor medio por célula = 1,95 pg).

La transformación transitoria de protoplastos de musgo con la secuencia codificante de la proteína To32 semejante a taumatina dio como resultado 5 μg/ml por 6,6 x 10^4 células (valor medio por célula = 75 pg) durante 24 h.

Ejemplo 3

Producción transitoria de anticuerpos en protoplastos de Physcomitrella patens

Vectores de expresión

Se generan vectores de expresión por clonación roma de productos PCR de lectura de pruebas *Pfu* de cadena pesada (HC; 1410 pb) o ligera (LC; 711 pb), respectivamente, en el sitio de restricción con SmaI de pRT101 (Töpfer *et al*. (1987), NAR, 15, p5890). Como molde sirve el homólogo humano de LC kappa (número de acceso GENBACK BC005332, contenido en el clon IMAGE 3934658; véase la secuencia más adelante) y, en el caso de la HC, o constructo de DNA sintético (véase la secuencia más adelante), que es una fusión de un precursor HC de IgG humana (número de acceso GENBANK AF135164) y la región constante de HC de IgG4 humana (número de acceso GENBANK K01316). Condiciones de la PCR: 2 min 94ºC; 30 ciclos: 20 s 94ºC/10 s 50ºC/1 min/kb 72ºC; extensión: 10 min, utilizando iniciadores con 22 nucleótidos de longitud, partiendo del codón correspondiente de inicio o de parada, respectivamente. En tales constructos de expresión están localizados el promotor 35S de CaMV, las secuencias codificantes de HC o LC con inclusión de sus péptidos señal endógenos correspondientes (señales de clasificación para la secreción), y como terminador de la transcripción se utiliza la señal de terminación de 35S de CaMV.

Número de acceso a GENBANK BC005332 (pb 21-731:

5'-

ATGGACATGAGAGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGAC

ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTCGGAGACACAGTCACCATCACTTGTCGG

GCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTG
ATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCAATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAAAGT
TATCCTGTCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC
TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG -3'

Constructo HC sintético:

pb1-437: número de acceso a GENBANK AF135164

pb438-1410: número de acceso a GENBANK K01316 (con eliminación de los intrones)

5'-
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTG
GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTC
ACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTT
ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGACTCACCATCTCCAGAGAC
AATTCCAAGAACACACTGTATCTGGAAATGAACAGCCTGAGAACCGAGGACACGGCCACATATTACTGT
GCGAAAGATCTCATGGCTCGGGGAGTCACCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAAGGTC
ACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCA
CCTGAGTTCCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA -3'

Transformación transitoria

El protocolo es el mismo que se ha descrito arriba.

En cada transformación, los vectores de expresión para ambas cadenas, HC y LC, se co-transforman utilizando 20 microgramos de DNA plasmídico sin cortar superenrollado por constructo.

Las muestras se toman al cabo de 48 horas.

Verificación del producto

Detección de los ensamblajes de las cadenas ligera y pesada

Recubrimiento: LC Kappa anti-humana (Sigma, Cat #K4377; 1/300 en el tampón de recubrimiento (véase más adelante).

Conjugado: conjugado de peroxidasa IgG4 anti-humana (Sigma, Cat #A2290; 1:1000 en PBS (véase más adelante) + 0,1% de BSA).

Estándar: Kappa IgG4 Humana (40 ng/ml de TBS 20 mM (pH 8,0) Sigma, Cat #14639), diluido serialmente 8 veces (en PBS + 0,1% BSA) 1:2 para el ensayo (dilución hasta 256 veces).

Protocolo: se recubre una placa ELISA de 96 pocillos con 50 μl/pocillo de solución de recubrimiento. Se deja en reposo durante una noche a 4ºC. Se sacude brevemente la solución y se lava 3 veces a 100 μl/pocillo con PBS-T (véase más adelante). Se extiende en placas y se bloquea luego utilizando 200 μl/pocillo PBS + 1% BSA. Se deja en reposo 90 minutos a 37ºC. La solución de bloqueo se sacude brevemente, se lava 3 veces a 100 μl/pocillo con PBS-T y se aplican 50 μl/pocillo de estándares/muestras. Se deja en reposo 90 minutos a 37ºC. Se lava 3 veces la placa a 100 μl/pocillo con PBS-T. Se aplica el conjugado a 100 μl/pocillo. Se deja durante 40 minutos a la temperatura ambiente. La placa se lava 3 veces a 100 μl/pocillo con PBS-T. Se añaden 100 μl/pocillo de TMB (trimetilbencidina; Dunn Labortechnik; cat #TMBE-500), y se para la reacción al cabo de 10 minutos por adición de 50 μl/pocillo de H_2SO_4 2M. Se mide la absorción a 450 nm (longitud de onda de referencia: 610 nm; lector ELISA; Labsystems Multiskan RC).

Tampón de recubrimiento: titulación de 70 ml de Na_2CO_3 0,1 M (10,6 g/l, anhidro) con 175 ml de $NaHCO_3$ 0,2M (16,8 g/l, anhidro).

10 x PBS: 20 ml de KH_2PO_4 1M/80 ml de K_2HPO_4 1M/87,66 g NaCl y 1000 ml de PBS-T: PBS/0,05% (v/v) Tween 20.

Resultados

Detección de los ensamblajes de cadena ligera y pesada

Los ensamblajes de cadena ligera y pesada se detectan en varios experimentos independientes.

Referencias

De **Loose** M, **Tire** GG, **Gielen** J, **Villarroel** R, **Genetello** C, Van **Montagu** M, **Depicker** A and **Inze** D (1991) The extensin signal peptide allows secretion of a heterologous protein from protoplasts. *Gene* 99, 95-100.

Denecke J, **Botterman** J and **Deblaere** R (1990) Protein secretion in plant cells can occur via default pathway. *The Plant Cell* 2, 51-59.

De **Wilde** C, De **Rycke** R, **Beeckman** T, De **Neve** M, Van **Montagu** M, **Engler** G and **Depicker** A (1998) Accumulation pattern of IgG antibodies and Fab fragments in transgenic Arabidopsis thaliana plants. *Plant Cell Physiol* 39, 639-646.

Dirnberger D, **Steinkellner** H, **Abdennebi** L, **Remy** J-J and van de **Wiel** D (2001) Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants. *Eur J Biochem* 268, 4570-4579.

Edman P and **Begg** G (1967) A protein sequenator. Eur J Biochem 1, 80-91.

Engel PP (1968) The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Am J Bot* 55, 438-446.

Fiebich BL, **Jäger** B, **Schöllmann** C, **Weindel** K, **Wilting** J, **Kochs** G, **Marme** D, **Hug** H and **Weich** HA (1993) Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J Biochem* 211, 19-26

Fischer R, **Vaquero-Martin** C, **Sack** M, **Drossard** J, **Emans**, N and **Commandeur** U (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem* 30, 113-116

Fischer R and **Emans** N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9, 279-299.

Gorr G (1999) Biotechnologische Nutzung von *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. Dissertation, Universität Hamburg.

Grimsley NH, **Ashton** NW and **Cove** DJ (1977) The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* 154, 97-100.

Hohe A, **Reski** R (2002) Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Sci* 163, 69-74.

Hoube-Herin N, **Pethe** C, **d'Alayer** J, **Laloue** M (1999) Cytokinin Oxidase from *Zea Mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss Protoplasts. *The Plant Journal* 17(6), 615 - 626.

Kiessling J, **Kruse** S, **Rensing** SA, **Harter** K, **Decker** EL and **Reski** R (2000) Visualization of a Cytoskeleton-like FtsZ Network in Chloroplasts. *J Cell Biol* 151, 945-950.

Magnuson NS, **Linzmaier** PM, **Gao** J-W, **Reeves** R, **An** G and **Lee** JM (1996) Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Prot Expr Pur* 7, 220-228.

Reski R, **Abel** WO (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354-358.

Reski R, **Faust** M, **Wang** X-H, **Wehe** M, **Abel** WO (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. *Mol Gen Genet* 244, 352-359.

Rother S, **Hadeler** B, **Orsini** JM, **Abel** WO and **Reski** R (1994) Fate of a mutant macrochloroplast in somatic hybrids. *J Plant Physiol* 143, 72-77.

Reutter K and **Reski** R (1996) Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2, 142-147.

Schaefer D, **Zryd** J-P, **Knight** CD and **Cove** DJ (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* 226, 418-424.

Schaefer DG (2001) Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens*. http://www.unil.ch/lpc/docs/PPprotocols2001.pdf

Sheen J (2001) Signal transduction in maize and arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127, 1466-1475.

Töpfer R, **Matzeit** V, **Gronenborn** B, **Schell** J and **Steinbiss** H-H (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *NAR* 15, 5890.

Vaquero C, **Sack** M, **Chandler** J, **Drossard** J, **Schuster** F, **Monecke** M, **Schillberg** S and **Fischer** R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11128-11133.

Zeidler M, **Hartmann** E and **Hughes** J (1999) Transgene expression in the moss Ceratodon purpureus. *J Plant Physiol* 154, 641-650.

TABLA 1

Expresión transitoria y secreción de $VEGF_{121}$ en protoplastos de musgo utilizando secuencias peptídicas conductoras diferentes y deleciones de las mismas

constructo	valor medio rh VEGF	porcentaje
pRT101TPVEGF C3	8,47 ng/ml +/- 1,95	100
pRT101TPVEGF-1 C3	0,21 ng/ml +/- 0,06	2,48
constructo	valor medio rh VEGF	porcentaje
pRT101TPTo32 C3	26,83 ng/ml +/- 6,25	100
pRT101TPTo32-1 C3	2,18 ng/ml +/- 0,67	8,13

La construcción de vectores se describe en Métodos y Materiales. Las cantidades de $VEGF_{121}$ secretado se midieron por ELISA. Los valores medios y la desviación estándar se calcularon a partir de tres experimentos de transformación realizados en paralelo.

TABLA 2

Expresión transitoria y secreción de $VEGF_{121}$ en protoplastos de musgo utilizando diferentes secuencias de péptidos conductores

constructo	valor medio rh VEGF	porcentaje
PRT101TPVEGF C3	41,7 ng/ml +/- 6,9	100
PRT101TPTo32 C3	123,3 ng/ml +/- 11,1	295

La construcción de vectores se describe en Métodos y Materiales. Las cantidades de $VEGF_{121}$ secretado se midieron por ELISA. Los valores medios y la desviación estándar se calcularon a partir de tres experimentos de transformación realizados en paralelo.

TABLA 3

Tasas de secreción (por 24 h) de $VEGF_{121}$ en protoplastos de musgo transformados transitoriamente cultivados en diferentes medios

Medio	24 h	48 h	72 h	96 h	Rendto. total
3M	1,72 ng/ml	5,85 ng/ml	4,48 ng/ml	4,3 ng/ml	16,35 ng/ml
W5	6,25 ng/ml	7,05 ng/ml	5,05 ng/ml	2,43 ng/ml	20,77 ng/ml
MMS	5,12 ng/ml	4,54 ng/ml	4,68 ng/ml	0,86 ng/ml	15,20 ng/ml

Las tasas de secreción se calculan como se describe en Métodos y Materiales. Los valores medios se calcularon a partir de tres experimentos de transformación realizados en paralelo. Se utilizó para la transformación el constructo pRT101TPVEGF.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción transitoria de una o más proteínas extracelulares no procedentes de plantas en un protoplasto de musgo, método que comprende los pasos de transformar transitoriamente el protoplasto con un constructo de ácido nucleico que comprende una o más secuencias nucleotídicas heterólogas codificantes de dicha o dichas proteínas no procedentes de plantas enlazadas operativamente a un promotor, y cultivar el protoplasto transformado a fin de producir dicha o dichas proteínas no procedentes de plantas, en donde dicho cultivo tiene lugar durante al menos 48 horas en un medio de cultivo seleccionado del grupo constituido por W5, 3M y MMS.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el paso de obtener dicha o dichas proteínas no procedentes de plantas del medio de cultivo.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el protoplasto es de *Physcomitrella patens*.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el volumen del medio de cultivo está comprendido en el intervalo de 50 μl - 1000 μl.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el volumen del medio de cultivo está comprendido en el intervalo de 100 μl - 600 μl.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el volumen del medio de cultivo está comprendido en el intervalo de 100 μl - 300 μl.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el volumen del medio de cultivo es 200 μl ± 50 μl.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende dos o más secuencias nucleotídicas heterólogas.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los ácidos nucleicos están presentes en un solo constructo vector.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el promotor es un promotor inducible.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una proteína o polipéptido que es una proteína animal.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una proteína o polipéptido que es una proteína de mamífero.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una proteína seleccionada del grupo constituido por un heterodímero, un anticuerpo de fusión, una inmunoglobulina, y un anticuerpo monocatenario.

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una proteína o polipéptido que es una proteína fúngica.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una proteína o polipéptido que es una proteína bacteriana.