(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 821**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **03017114 .4**
(96) Fecha de presentación : **28.07.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1502953**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

(54) Título: **Promotores inducibles para la expresión de proteínas en plantas y métodos para detectarlos.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.06.2009

(73) Titular/es: **Universität Hohenheim**
70593 Stuttgart, DE

(72) Inventor/es: **Pfitzner, Artur y**
Roth, Bernhard

(74) Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

Promotores inducibles para la expresión de proteínas en plantas y métodos para detectarlos.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico que contiene secuencias reguladoras inducibles, en particular promotores, para una expresión controlada de productos de expresión deseados en organismos huéspedes de expresión adecuados tales como las plantas transgénicas. Además, la presente invención se refiere a un método para detectar la actividad de una secuencia reguladora en células adecuadas, en las cuales un transgen comprende una secuencia reguladora potencial ligada de forma operable al gen Bax o un derivado funcional del mismo y la expresión de Bax está en correlación con la actividad de la secuencia reguladora en dichas células.

Con referencia a las aplicaciones industriales y médicas (por ejemplo, enzimas para usos técnicos, anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, vacunas), la expresión de las proteínas en las plantas transgénicas es cada vez más interesante para las compañías farmacéuticas y químicas. Los motivos más importantes son la seguridad y los costes. Tradicionalmente, las proteínas valiosas para aplicaciones farmacéuticas (hormonas, anticuerpos, etc.) se producen en células cultivadas de animales. Como la mayoría de los medios de cultivo contienen un 10% o más de suero de ternera fetal (FCS), existe siempre un riesgo de contaminación con agentes causales de la BSE. Además, los cultivos de tejidos animales se pueden contaminar con virus que se pueden transmitir a los humanos. Adicionalmente, debido al FCS y otros aditivos, los medios de cultivo son a menudo muy caros. Los costes adicionales proceden de la gran energía necesaria para el control de temperaturas de grandes entidades de cultivo. Esto se comprueba también para la producción de proteínas recombinantes en los microorganismos.

El cultivo de plantas es barato debido a que se necesitan solamente luz solar, agua y algunos productos nutritivos para respaldar el crecimiento de las plantas. Además, las plantas se pueden cultivar en campos en una cantidad casi ilimitada. Por lo tanto, no existen problemas de ampliación. Sin embargo, un requisito esencial para la producción con éxito de una proteína heteróloga en un organismo transgénico es la combinación del transgen respectivo con elementos reguladores fuertes y fiables, los promotores. Los promotores conducen a una síntesis eficaz del mARN transgénico, que se traslada luego a la proteína.

Además, la WO 95/19443 describe el aislamiento, clonación e identificación de nuevos clones de cADN que codifican para las proteínas relacionadas con la patogénesis.

Para la producción de proteínas recombinantes en plantas transgénicas, se utiliza principalmente el ARN 35S (Pietrzak y col., (1987) Nucleic Acids Res. 14:5857). El promotor 35S se aisló en un principio del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y esto llevó a una alta síntesis constitutiva de una transcripción de los genes deseados. Otros promotores, que son menos frecuentes en su uso son el promotor de ARN 19S procedente de CaMV (Paszkowski y col., (1985) Mol. Gen. Genet. 199:178) y el promotor procedente del gen nopalina sinteasa del *Agrobacterium tumefaciens* (An y col., (1984) EMBO J. 4:277).

Todos estos promotores son activos durante toda la vida de una planta y por lo tanto la proteína recombinante se sintetiza todo el tiempo. Si estas proteínas se acumulan continuamente durante el desarrollo de la planta, se pueden degradar o modificar y en consecuencia pierden su actividad biológica. En la mayoría de los casos, la proteína expresada es nociva o incluso letal para la planta en particular. Esto puede representar un obstáculo mayor en el establecimiento de plantas transgénicas con altos niveles de expresión. En este caso, no es posible obtener planta transgénica alguna, o solamente plantas que muestran niveles muy bajos de expresión proteica.

Por lo tanto, sería muy deseable poseer un promotor que pueda conectarse específicamente en cualquier momento del desarrollo de la planta mediante el tratamiento de la planta con productos químicos. Las plantas transgénicas podrían crecer hasta un tamaño apropiado y luego la expresión de la proteína recombinante se podría inducir a un alto nivel durante un corto tiempo. De esta forma se podrían evitar problemas como la degradación de la proteína o la muerte de las plantas por la proteína heteróloga.

Los promotores vegetales más destacados que pueden ser inducidos por productos químicos son los promotores de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Los genes de PR son inducidos durante la reacción de defensa en la planta contra los patógenos. Se desconectan la mayor parte del tiempo durante el desarrollo de la planta y pueden ser inducidos por el ácido salicílico de las hormonas vegetales. El mayor problema con estos promotores proviene del hecho de que son inducidos también por un estímulo del desarrollo poco tiempo antes de la floración de las plantas (Grüner and Pfitzner (1994) Eur. J. Biochem. 220:247). Por lo tanto, resulta muy difícil obtener semillas de plantas que expresan proteínas que son nocivas para determinado organismo.

Además, para la producción de proteínas en plantas transgénicas, es necesario conocer en qué partes de las plantas las regiones reguladoras, en particular los promotores, de los transgenes son activas e inducibles, respectivamente. Con el fin de analizar las regiones reguladoras en plantas vivas, es necesario expresar genes reporteros bajo el control de estas regiones reguladoras. Actualmente, se utilizan en plantas los genes reporteros GUS (β-Glucoronidasa), Luc (luciferasa) y GFP (proteína fluorescente verde). Sin embargo, estos genes reporteros no son muy sensibles y el análisis de todas las plantas durante toda su vida no es posible. Además, por contraste con las células animales, las células vegetales poseen una pared celular rígida. Por lo tanto, la aplicación del substrato para los genes reporteros GUS y Luc es difícil, defectuosa, lleva mucho tiempo y es cara. Además, el uso de GFP en plantas es difícil debido a su autofluorescencia.

Actualmente, no se dispone de ningún gen reportero para detectar de forma sensible, fácil y durante toda la vida de una planta la actividad de las regiones reguladoras.

Así, el problema técnico subyacente en la presente invención consiste en proporcionar secuencias reguladoras, en particular para plantas, que puedan ser conectas selectivamente por productos químicos añadidos externamente induciendo por este medio la expresión de transgenes, caracterizada porque las secuencias reguladoras no deberían ser conectadas durante el desarrollo normal por ejemplo de la planta. Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para detectar la actividad de una secuencia reguladora en plantas o partes de las mismas, caracterizada porque la actividad reguladora es fácilmente detectable durante toda la vida de la planta.

La solución de los problemas técnicos anteriores es conseguida por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO:1 que está ligada de forma operable a un transgen.

La secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO:1, comprende una secuencia reguladora, en particular una secuencia promotora. El término "secuencia reguladora" incluye una secuencia de nucleótidos que contiene elementos necesarios para la expresión/transcripción de un producto deseado. La secuencia reguladora puede ser un elemento regulador que no exprese constitutivamente, por ejemplo un gen, pero que sea inducible selectivamente por productos químicos lo que resulta en una expresión, por ejemplo de un gen, a su inducción. La expresión "expresión no constitutiva" significa que la secuencia reguladora tal como una secuencia promotora preferentemente es totalmente inactiva antes de cualquier medida que resulte en una inducción de la misma. En una realización preferente de la presente invención, la primera secuencia de nucleótidos es un promotor vegetal inducible.

En una realización preferente de la presente invención, los productos químicos están seleccionados a partir del grupo que se compone de compuestos orgánicos. Los productos químicos especialmente están seleccionados a partir del grupo que incluye compuestos fenólicos, tiamina, ácido benzoico, ácido isonicotínico (INA), y los derivados de los mismos. Los compuestos fenólicos son por ejemplo, ácido salicílico o los derivados estructural o funcionalmente relacionados de los mismos.

El ácido nucleico definido anteriormente, SEQ ID NO:1, está ligado de forma operable a una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia deseada (aquí denominada también "transgen") que ha de expresarse como un gen funcional. No existe ninguna limitación particular de la secuencia que ha de expresarse, y a su expresión en un organismo huésped adecuado, la secuencia resulta, por ejemplo en un polipéptido, una proteína o una molécula de ARN.

El término "ligado de forma operable" significa que la primera y la segunda secuencias de nucleótidos están conectadas entre sí de modo tal que la primera secuencia de nucleótidos controle la transcripción de la segunda secuencia de nucleótidos.

La presente invención se refiere asimismo a vectores que comprenden el ácido nucleico definido anteriormente, de acuerdo con la invención. Los ejemplos de vectores son pBin19, pGC4-00, pUC18/19, pBluescript.

La presente invención se refiere también a un organismo huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención. El organismo huésped es por ejemplo un organismo procariótico tal como *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens,* o un organismo eucariótico tal como una célula vegetal (incluida una planta transgénica). El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, puede estar incluido también en un virus o viroide adecuado para la preparación de un organismo transgénico tal como una planta transgénica.

Además, la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico definido anteriormente para la preparación de una planta transgénica cuyo transgen es inducible selectivamente por productos químicos añadidos exógenamente. La expresión "productos químicos añadidos exógenamente" incluye productos químicos que no son producidos por la planta misma (o producidos solamente en cantidades que no causan sustancialmente inducción de la secuencia reguladora definida anteriormente), y productos químicos que son producidos por la planta en algún momento durante su vida. El término "inducible selectivamente" significa que la expresión del transgen es inducida sustancialmente ("conectada") sólo mediante la adición de productos químicos específicos.

La presente invención se refiere además a una planta transgénica tal como una planta de tabaco, planta de tomate o planta de patata que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención con el propósito de una expresión regulada de cualquier transgen homólogo o heterólogo. El término "planta transgénica" incluye toda la planta como tal y partes de la misma, tal como raíz, tallo, hoja, células o tejido específico del órgano, la materia reproductora de la misma, especialmente las semillas y plantas de semillero de la misma. El término "transgen heterólogo" significa un gen que deriva de una fuente distinta del tipo salvaje de la planta transgénica. El término "transgen homólogo" significa un gen que deriva del tipo salvaje de la planta transgénica. En una realización de la presente invención, la planta transgénica contiene el ácido nucleico de la invención definido anteriormente integrado de forma estable en el material genético. Alternativamente, la planta transgénica expresa transitoriamente la secuencia deseada contenida en el ácido nucleico definido anteriormente.

En una realización preferente de la presente invención, la expresión del transgen definido anteriormente es inducida después del tratamiento con productos químicos de la planta transgénica.

Sorprendentemente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es capaz de inducir selectivamente la expresión de una secuencia deseada ("transgen") por ejemplo en plantas transgénicas después de su tratamiento con ciertos productos químicos. En consecuencia, es posible cultivar las plantas transgénicas hasta una tamaño suficiente para obtener suficiente material vegetal, y luego inducir la expresión de un transgen que resulta en el producto deseado tal como, por ejemplo, un polipéptido, una proteína o una molécula de ARN.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y el vector de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por medio de métodos de la técnica anterior. Esto incluye también los métodos para cultivar células huésped adecuadas y recuperar dichos ácidos nucleicos o dichos vectores de dichas células huésped y/o del medio de cultivo.

Las figuras muestran:

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor NIMIN-1 (SEQ ID NO:1).

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor NIMIN-2 (SEQ ID NO:2).

La Figura 3 muestra un diagrama de barras que compara la actividad GUS (beta-glucoronidasa) de las construcciones de fusión PR1a-GUS (321-9) y NIMIN2-GUS (322-7) en plantas transgénicas después de la inducción con ácido salicílico (SA) o Bion, caracterizado porque la actividad GUS de las construcciones de fusión tratadas con agua en plantas transgénicas se utiliza como control de fondo.

La Figura 4 muestra un diagrama de barras que pone en correlación la cantidad de SA utilizada para el tratamiento de la planta con la actividad GUS en dos plantas transgénicas NIMIN2-GUS independientes (322-1 y 322-7) después de la inducción con ácido salicílico (SA), caracterizado porque la actividad GUS de las construcciones de fusión tratadas con agua en plantas transgénicas se utiliza como control de fondo.

La Figura 5 muestra un Western Blot que pone en correlación la cantidad de SA utilizada para el tratamiento de la planta con la expresión de las proteínas PR-1 endógenas en la planta transgénica 322-2 tal como se describe en la Fig. 4, y que se utiliza como control positivo.

La Figura 6 muestra la expresión espontánea del gen Bax bajo el control del promotor PR-1a (A) en hojas y (B) en el tallo de plantas transgénicas de tabaco.

La Figura 7 muestra plantas que contienen el gen humano Bax bajo el control del promotor PR-1a (A), el promotor NIMIN-2 (B) o el promotor NIMIN-1 (C y D).

Ahora se ilustra además la presente invención en los siguientes ejemplos, sin que se limite a los mismos.

Ejemplo 1

Aislamiento de los promotores NIMIN-1 y NIMIN-2

Los cADN para las proteínas NIMIN, NIMIN-1, NIMIN-2 y NIMIN-3 han sido aislados como nuevas proteínas interactuantes con la proteína reguladora NPR1 en *Arabidopsis thaliana* (Weigel y col., (2001) Plant Mol. Biol. 46:143). Se demostró que los mARN para las proteínas NIMIN-1 y NIMIN-2 eran inducibles por el ácido salicílico y Bion, sustancia que puede sustituir el ácido salicílico en algunas de sus funciones (Weigel y col., (2001) Plant Mol. Biol. 46:143). Para identificar los elementos reguladores responsables de esta inducción, los elementos promotores se amplificaron mediante PCR de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* utilizando los iniciadores N1-P1 (SEQ ID NO:3) y N1-P2 (SEQ ID NO:4) para NIMIN-1 y N2-P1 (SEQ ID NO:5) y N2-P2 (SEQ ID NO:6) para NIMIN-2 (N1-P1: 5'-CCAAGCTTGTCTCATGAATTCGTGGTATAGCG-3'; N1-P2: 5'-CCGGATCCTTAGA GAAAGTGATTGATTTTGG-3'; N2-P1: 5'-CCCCACGTTAACGATGATCAC-3'; N2-P2: 5'-CTGGATCCCGTCG TTTAAGCTTAGTCAA-3'). Se analizaron los fragmentos respectivos de PCR sobre un gel de agarosa y se produjeron los tamaños esperados (1,1 kb para NIMIN-1 y 1,2 kb para NIMIN-2). Se cortaron los fragmentos con las enzimas de restricción HindIII y BamHI (elemento del promotor NIMIN-1) o BgIII y BamHI (elementos del promotor NIMIN-2) y se ligaron en el vector de clonación pUC19. Se secuenciaron los clones resultantes y se muestra la secuencia de nucleótidos en la Figura 1 (NIMIN-1) y Figura 2 (NIMIN-2).

Ejemplo 2

Construcción de las fusiones con genes reporteros y generación de plantas transgénicas

Los fragmentos de ADN que contenían las secuencias respectivas de los promotores se extirparon de los subclones pUC19 y se ligaron en pUC/0-GUS (Beilmann y col., (1991) Eur. J. Biochem. 196:415). Los productos de ligación resultantes se analizaron mediante una digestión con enzimas de restricción con EcoRI (NIMIN1-GUS) o XbaI y EcoRi (NIMIN2-GUS). La banda de 3,2 kb, que representa la fusión con el promotor-gen reportero se extirpó de un

gel de agarosa y se ligó en el vector pBin19 de *Agrobacterium,* produciendo pBin19/N1-GUS y pBin19/N2-GUS. Los plásmidos se trasladaron de *E. coli* a *Agrobacterium tumefaciens* a través del acoplamiento triparental.

Se utilizaron las coloraciones resultantes de *Agrobacteria* para generar plantas transgénicas que contenían las construcciones con genes reporteros.

Ejemplo 3

Caracterización de las actividades promotoras de los promotores NIMIN

Para caracterizar la influencia de los productos químicos sobre la actividad de los promotores NIMIN, se perforaron discos de hojas procedentes de las líneas transgénicas NIMIN1-GUS y NIMIN2-GUS. Como control, se utilizaron fusiones con el promotor PR-1a. Se dejaron flotar los discos de hojas sobre 1 mM de SA, 140 mg/l de Bion (análogo funcional del ácido salicílico) o agua. Después de 3 días, se prepararon extractos proteicos y se sometió a ensayo la actividad del gen reportero GUS en los extractos. Las actividades resultantes del gen reportero eran 5 veces más altas en las fusiones con el promotor NIMIN-2 que en las fusiones con el promotor PR-1a (véase la Figura 3). Además, los discos de hojas procedentes de las líneas transgénicas NIMIN1-GUS y NIMIN2-GUS se incubaron con distintas concentraciones de ácido salicílico. La actividad de los promotores NIMIN depende de la concentración de ácido salicílico (véase las Figuras 4 y 5).

Ejemplo 4

Construcción de una fusión con un gen reportero (Bax) con el promotor PR-1a y generación de plantas transgénicas de tabaco - Ejemplo de Referencia

El vector pUC19/His(Bax) fue digerido con las enzimas de restricción SacI y BgIII. El fragmento de ADN resultante que contenía el gen alfa Bax humano respectivo con una etiqueta N-terminal 6x His fue ligado en el vector binario pBin19/PR1a-GUS (Beilmann y col., (1992) Plant Mol. Biol. 18:65), en el cual se extirpó antes el GUS con las enzimas de restricción SacI y BamHI. El producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5α, y las colonias resultantes se analizaron mediante la digestión con enzimas de digestión con EcoRI e HindIII así como PCR, produciendo el vector pBin19/PR1a-Bax. El plásmido se trasladó de *E. coli* a *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediante electroporación. Se utilizó la cepa resultante de *Agrobacterium* para generar plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN/nn) que contenían la construcción con el gen reportero.

Ejemplo 5

Análisis de la regulación de los promotores NIMIN por estímulos endógenos

La característica más importante de un promotor inducible no sólo es la inducibilidad por sustancias exógenas sino también que el promotor se desconecta en condiciones normales. Para investigar si los promotores NIMIN cumplen con estos requisitos, se generaron plantas transgénicas de tabaco con fusiones con Bax-promotor NIMIN tal como se describe anteriormente. Bax es letal para cualquier célula. Por lo tanto, toda falta de ajuste del promotor NIMIN conduciría a zonas necróticas en las plantas. Se cultivaron las plantas en el invernadero y se comprobó su fenotipo.

Aunque el uso del promotor PR-1a resultó en mayores regiones necróticas más tarde en el desarrollo de las plantas (véase la Figura 6 y la Figura 7), no se observaron zonas necróticas en las plantas con NIMIN2-Bax y sólo lesiones menores en las hojas inferiores de las plantas con NIMIN1-Bax (véase la Figura 7B-D).

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 que es ligada de forma operable a un transgen.

2. El ácido nucleico según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos es una secuencia reguladora.

3. El ácido nucleico según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la secuencia reguladora es una secuencia promotora selectivamente inducible por productos químicos.

4. El ácido nucleico según la reivindicación 3, **caracterizado** porque los productos químicos están seleccionados a partir del grupo que incluye compuestos orgánicos.

5. El ácido nucleico según la reivindicación 4, **caracterizado** porque los compuestos orgánicos están seleccionados a partir del grupo que incluye compuestos fenólicos, tiamina, ácido benzoico, ácido isonicotínico (INA) y los derivados de los mismos.

6. El ácido nucleico según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el compuesto fenólico es ácido salicílico o un derivado estructural o funcional del mismo.

7. Un vector que contiene el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Un organismo huésped no humano que contiene el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector según la reivindicación 7.

9. El organismo huésped según la reivindicación 8, que está seleccionado a partir del grupo compuesto de una célula bacteriana o de una célula vegetal.

10. Una planta transgénica que contiene al menos el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. La planta transgénica según la reivindicación 10, **caracterizada** porque el ácido nucleico se integra de forma estable en el material genético.

12. La planta transgénica según la reivindicación 10 u 11, **caracterizada** porque el transgen se expresa transitoriamente.

13. La planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizada** porque la expresión del transgen se induce selectivamente a su tratamiento con productos químicos.

14. La planta transgénica según la reivindicación 13, **caracterizada** porque los productos químicos están seleccionados a partir del grupo que incluye compuesto orgánicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

GAATTCGTGG TATAGCGTTA CTTAATAACA ATTATAAACT GTAAAATATA
AATATTTTAT AAAAATAAAA TTTGCAAGTT TTAATATATA TTATTTTTAA
AAATAAATCG TCCCGCGATA TACCGCGGGT TAAAATCTAG TTTCTTTTTG
TTTATGTAAC ATCAATAGAG GTAATCTAAT TACCATTCAT TTAAAATACC
AAAAATAGGG GAAAAAATGT TCTTCGTTGG AATCCAATTG TTCCACACAA
ATTTCACATA TACAAATTAA TTTAATTTAC ATACAAGTGG CCGACAATAT
GAGATTTTAT TCGACAAATC TTTTATATAA CCTCATCATT CACAATTTAA
TAGTAAAATA GTACGTTAAT ATATCAACCT TTTCAAGCAT TATGGTATTC
TCCATCCTTA GATTCAAAAA CATATGCCTG AAATATTAGA TCTAACGGTT
GATAGTAATA GAGTGCTGTA CACTCGGATC TACTAGAATA TCTCTCCAAG
ACCAACCACG AGTAAAGTAA ACGCATCAAG TCAAGTTTTT GATGATTAGA
GTCTTTCTTT ATTTCAAAAG TATATCCAAG TAGATTAGTG TTGTATAGAT
TACGTCATCA TTGTGACATC ATCTCGTAAC CGCTTCATGT CACGTTGTCA
TCCCAAACAC ATCATCATCT GACGTAATTT TAACGTTGAT ATCTCCGCGT
TCTTTTACTC TTTTACCCCT GGTCCCTTTT TTAACAATTA TAAAAATTAT
GATTACTATT TTGAATTTAC AGGGAACCAA AAAACCCATT TATAAAGTTT
CGAAATTAAA TATCCTAACT AACTTGGAAA AATATCTCCA ATTTTCGTTT
TTTGTGGTTT AAATTGTAAC TAGGAAACTA AAAGGACTAA AGAGTAAAAG
AGGTGGGGAC AGGGTGTTTT AGTCTTTTTC TAAGAAGTTT CGTGATGACT
AATTTTTTTC CTTTAAAAGA AAGTCATCAG ACGAAAAGGA TTATTTGCCT
TCTTCACTCT CCAAAATCAA TCACTTTCTC TAA

Figura 1

GATCTCTATG TATATAAAAA TATGGGTAAT ATTAGAAACT AACTATGAAA
TGGAAAAGAA TTGAGAGAAT GACATTGTGT CAGAAAAGTT AGGTAAATAA
CATTTTCTGA AAAAGAGAAA ATACAAAAAT ATCCTTGTGT TTACTTATTT
TTACAATAAT GCCATTGGCT TTAGTTATAA AGTTTATATG TATTTGTCTA
AAATAGCATG ATATATTTAC AAAAATCATG CAATTCTTTA AAATACATAC
AGAATATATA TACACGATAT ATATGTTTCT CTGAAATAAT GTGTTTCTCA
GAAATAGCAC GAAATATTTA TAAAAAGCAT GCAATTCTCT TATAGATCGC
GAAGTTTAAA AAAACATATA GAATTGTTAC AATATTACAT GGGTTTTTAT
TGGATAACAT GACAAATATT TATTTATTTC ATGAGTTTTT ATTGGATAGC
ATGACAAATA TTAATATATC AGTGTTAATA ACATGTTTTG TTCTTAAAAT
ACATGCATTT TAAAATCAGA CATTTGTTTT AAAATCAAAT CTAATCTCTT
ATATCACAAC GACATTGACG GAAAATTCAG GTAAAAAGAG AAAATAAAGA
ATGAGAGATA GAGAGATTTC TATGGAAAAA GAAAGAGAGA ACATGTAGGT
GAACAAAATA AAGAGATATG ATGATATATT TTATGAGAGG TGGTGAAGAT
TATTTTAGGA GAGGGAGAGA GAAATAGAAA AAGAAAATGA CATGGTGAAT
CTGAAGAAGA TGAATTGTGT TAAAGATGAA GAGAGAAAGA GAACTCCATG
GCTAAAGTCT CGTAAAGAAG ATGAAAAAGA AACAAAAGAA GGAAGAAGAA
AGAGAAAGGC TAAAATAGAC TAACTATTGC CAAAATTTCT GTAGCCGACA
AATACTATTT GGTCCAAGGT TATTTTGTGT ATTCTTTTGA AGTCAAAAGT
TATTTCTTAC ATATACTCTA AAAATATAGC CGATACCAAT TTTTCCACAC
ATGGACTTCC TTTATTCCAA AAGTCAATAA AGTGTGACGT CATGATACTT
ACGCTTTAAA ACATCGCATG ATGATGTCAT TAGCATCAAT CTCCACCGTC
CAATTTATTT AGTTGTTGAC AATATCGACC GTCTAAGTTC CACACCGACG
GCTATAAGAG TTTCATTATA AATTTTAGCA AAATAAAATC AGCAAATAAT
TTTTTCTTGA CTAAGCTTAA ACGACG

Figura 2

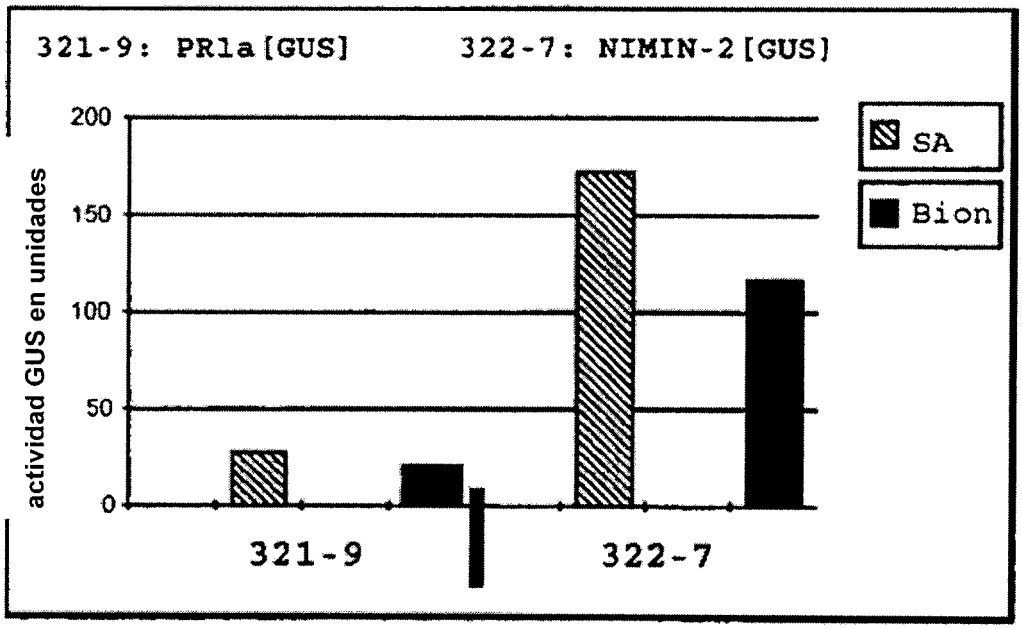

321-9: PR1a[GUS]
322-7: NIMIN-2[GUS]
actividad GUS en unidades
200
150
100
50
0
SA
Bion
321-9
322-7

Figura 3

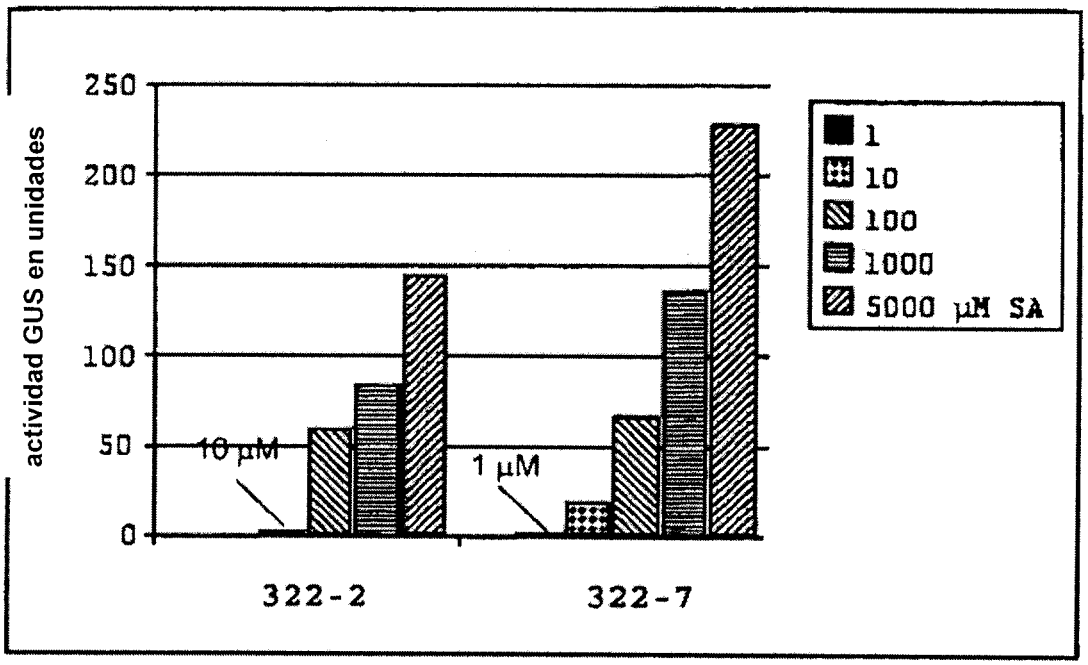

actividad GUS en unidades
250
200
150
100
50
0
10 µM
1 µM
322-2
322-7
1
10
100
1000
5000 µM SA

Figura 4

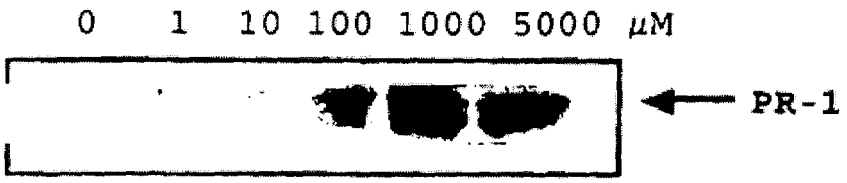
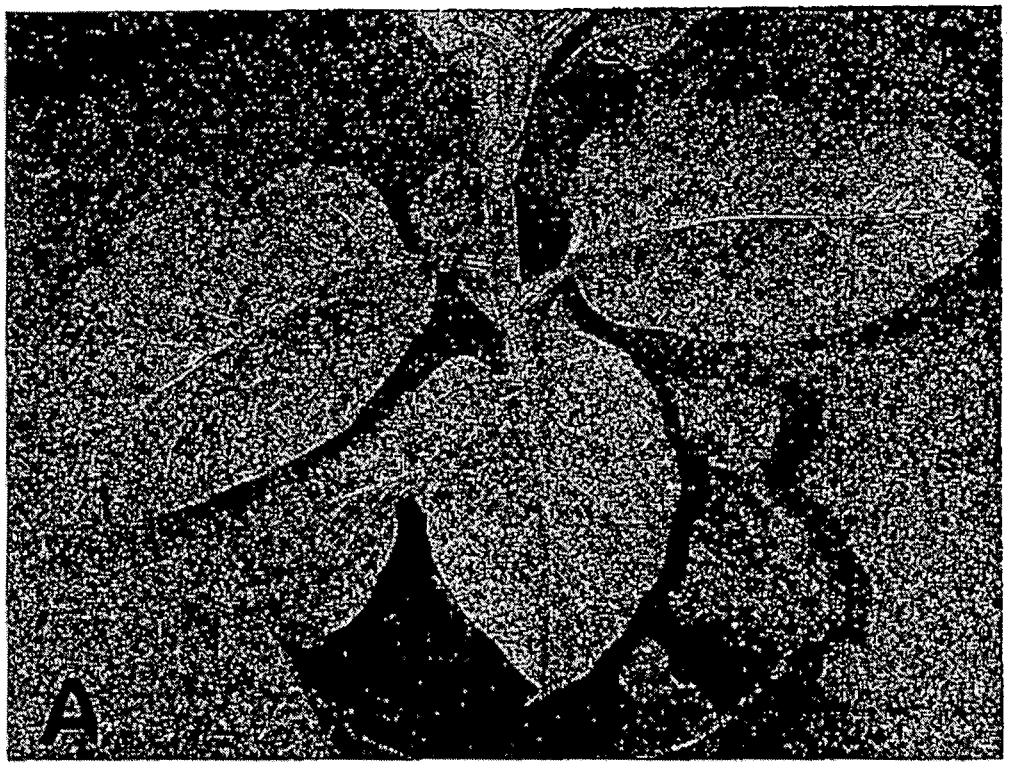


Figura 5



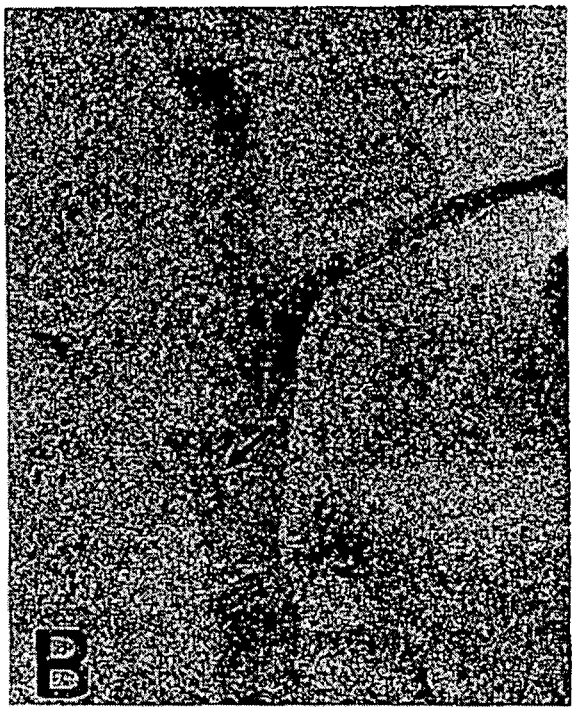


Figura 6

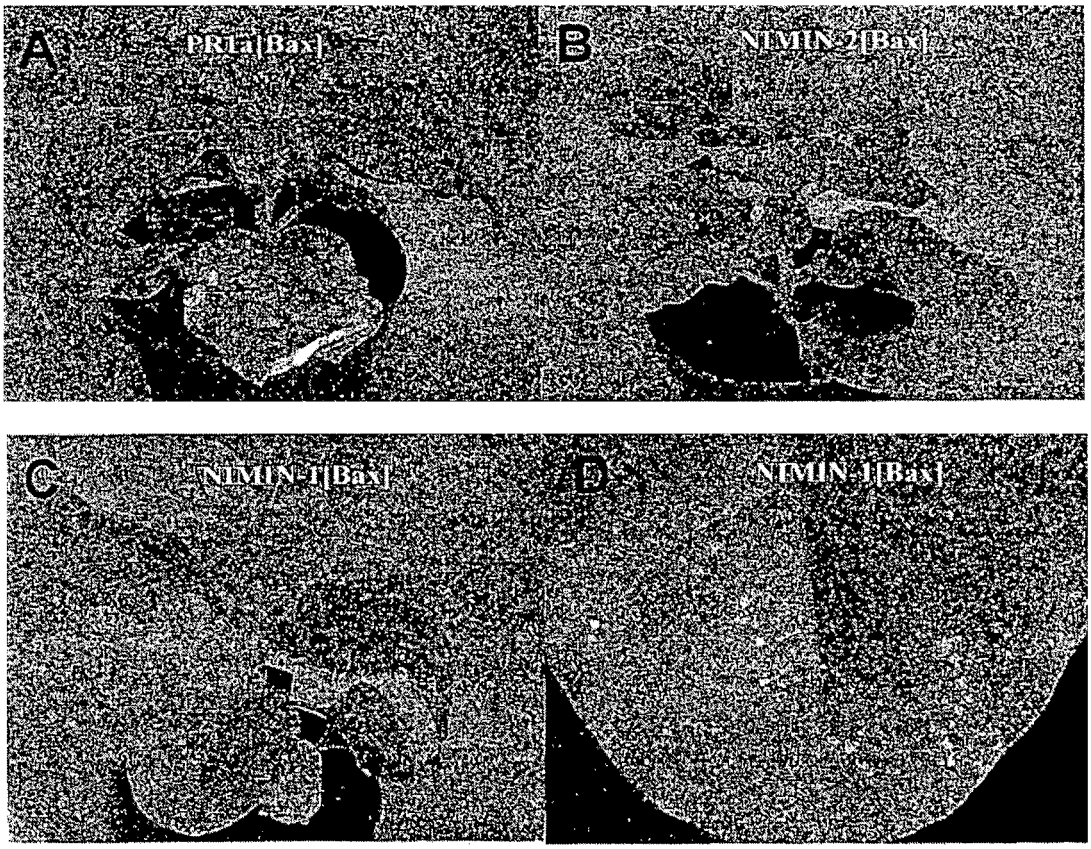


Figura 7

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universität Hohenheim
<120> Promotores inducibles para la expresión de proteínas en plantas y método para detectarlas.
<130> H 2269
<160> 6
<170> Versión patentIn 3.1.

<210> 1
<211> 1033
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

```
gaattcgtgg tatagcgtta cttaataaca attataaact gtaaaatata aatattttat     60
aaaaataaaa tttgcaagtt ttaatatata ttatttttaa aaataaatcg tcccgcgata    120
taccgcgggt taaaatctag tttctttttg tttatgtaac atcaatagag gtaatctaat    180
taccattcat ttaaaatacc aaaaataggg gaaaaaatgt tcttcgttgg aatccaattg    240
ttccacacaa atttcacata tacaaattaa tttaatttac atacaagtgg ccgacaatat    300
gagattttat tcgacaaatc ttttatataa cctcatcatt cacaatttaa tagtaaaata    360
gtacgttaat atatcaacct tttcaagcat tatggtattc tccatcctta gattcaaaaa    420
catatgcctg aaatattaga tctaacggtt gatagtaata gagtgctgta cactcggatc    480
tactagaata tctctccaag accaaccacg agtaaagtaa acgcatcaag tcaagttttt    540
gatgattaga gtctttcttt atttcaaaag tatatccaag tagattagtg ttgtatagat    600
tacgtcatca ttgtgacatc atctcgtaac cgcttcatgt cacgttgtca tcccaaacac    660
atcatcatct gacgtaattt taacgttgat atctccgcgt tcttttactc ttttaccccc    720
ggtccctttt ttaacaatta taaaaattat gattactatt ttgaatttac agggaaccaa    780
aaaacccatt tataaagttt cgaaattaaa tatcctaact aacttggaaa aatatctcca    840
attttcgttt tttgtggttt aaattgtaac taggaaacta aaaggactaa agagtaaaag    900
aggtggggac agggtgtttt agtcttttte taagaagttt cgtgatgact aatttttttc    960
ctttaaaaga aagtcatcag acgaaaagga ttatttgcct tcttcactct ccaaaatcaa   1020
tcactttctc taa                                                      1033
```

<210> 2
<211> 1226
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

gatctctatg tatataaaaa tatgggtaat attagaaact aactatgaaa tggaaaagaa 60

ttgagagaat gacattgtgt cagaaaagtt aggtaaataa cattttctga aaaagagaaa 120

atacaaaaat atccttgtgt ttacttattt ttacaataat gccattggct ttagttataa 180

agtttatatg tatttgtcta aaatagcatg atatatttac aaaaatcatg caattcttta 240

aaatacatac agaatatata tacacgatat atatgtttct ctgaaataat gtgtttctca 300

gaaatagcac gaaatattta taaaaagcat gcaattctct tatagatcgc gaagtttaaa 360

aaaacatata gaattgttac aatattacat gggtttttat tggataacat gacaaatatt 420

tatttatttc atgagttttt attggatagc atgacaaata ttaatatatc agtgttaata 480

acatgttttg ttcttaaaat acatgcattt taaaatcaga catttgtttt aaaatcaaat 540

ctaatctctt atatcacaac gacattgacg gaaaattcag gtaaaaagag aaaataaaga 600

atgagagata gagagatttc tatggaaaaa gaaagagaga acatgtaggt gaacaaaata 660

aagagatatg atgatatatt ttatgagagg tggtgaagat tattttagga gagggagaga 720

gaaatagaaa aagaaaatga catggtgaat ctgaagaaga tgaattgtgt taaagatgaa 780

gagagaaaga gaactccatg gctaaagtct cgtaaagaag atgaaaaaga aacaaaagaa 840

ggaagaagaa agagaaaggc taaaatagac taactattgc caaaatttct gtagccgaca 900

aatactattt ggtccaaggt tattttgtgt attcttttga agtcaaaagt tatttcttac 960

atatactcta aaaatatagc cgataccaat ttttccacac atggacttcc tttattccaa 1020

aagtcaataa agtgtgacgt catgatactt acgctttaaa acatcgcatg atgatgtcat 1080

tagcatcaat ctccaccgtc caatttattt agttgttgac aatatcgacc gtctaagttc 1140

cacaccgacg gctataagag tttcattata aattttagca aaataaaatc agcaaataat 1200

ttttttcttga ctaagcttaa acgacg 1226

<210> 3

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador N1-P1 para la amplificación del gen NIMIN-1

<400> 3

ccaagcttgt ctcatgaatt cgtggtatag cg 32

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador N1-P2 para la amplificación del gen NIMIN-1

<400> 4

ccggatcctt agagaaagtg attgattttg g 31

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador N2-P1 para la amplificación del gen NIMIN-2

<400> 5

ccccacgtta acgatgatca c 21

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Iniciador N2-P2 para la amplificación del gen NIMIN-2

<400> 6

ctggatcccg tcgtttaagc ttagtcaa 28