

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 744**

21 Número de solicitud: 201500093

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.10.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.05.2017**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA (100.0%)  
OTRI - Edificio de Servicios Centrales de  
investigación Campus de Elviña, s/n  
15071 A Coruña ES**

72 Inventor/es:

**VARELA RODRÍGUEZ , Bárbara ;  
FREIRE PICOS , María Ángeles ;  
RODRÍGUEZ TORRES , Ana María y  
ÁLVAREZ FELGAR, Tania**

54 Título: **Procedimiento para la detección de recombinación homóloga in vivo analizando formas de GFP recombinantes**

57 Resumen:

Procedimiento para detectar y cuantificar recombinación homóloga in vivo analizando formas de GFP recombinantes. Se emplean células de levadura expresando dos versiones de genes GFP (proteína fluorescente verde) con dos localizaciones subcelulares diferentes, una nucleolar y otra citosólica, gracias a la presencia de: a) un gen integrado en el genoma que expresa GFP fusionada a una proteína de localización nucleolar (RPA190) y b) un gen GFP en un plásmido, expresando una proteína GFP citosólica de baja intensidad. Ambas proteínas GFP-recombinantes se identifican in vivo por microscopía de fluorescencia dada su localización sub-celular.

La recombinación homóloga entre los genes GFP se cuantifica por la frecuencia de pérdida de las formas nucleolar o citosólica frente al total de las células de un cultivo. Es aplicable tanto a análisis de mutaciones en genes que afecten a frecuencia de recombinación (investigación básica) como al estudio de compuestos tóxicos como fármacos o vertidos medioambientales.

ES 2 610 744 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* analizando formas de GFP recombinantes.

5

### Objeto de la invención

El objeto de la invención es un procedimiento que permite detectar recombinación homóloga entre dos genes GFP recombinantes presentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

10

### Antecedentes de la invención

Existen diferentes formas de analizar la tasa de recombinación homóloga en células eucariotas. En el sistema clásico, aplicado a levaduras, se construían genes recombinantes (Aguilera and Klein 1989, Genetics 123: 683) y se utilizaban ensayos *Southern blot* (o posteriormente PCR) para detectar reorganizaciones génicas producidas por recombinación. Esto experimentalmente supone hacer al menos una extracción y una electroforesis para analizar una población de ácidos nucleicos celular, y combinar esta información con otra sobre cambios en auxotrofias, etc.

15

20

Se han descrito diferentes posibilidades de detectar mutaciones que afecten a recombinación en un determinado gen; así por ejemplo, el crecimiento en placas sin leucina de cepas que contienen integradas en el genoma formas recombinantes del gen *LEU2* interrumpidas. Si se da recombinación se reconstituye *LEU2* y se produce crecimiento (Stirling *et al.*, 2014, Genetics 196: 403-412; Prado and Aguilera 1995, Genetics 139: 109-123; Chávez *et al.*, 2000, The EMBOJ. 19: 5824-5834).

25

Otra forma de detectar recombinación es por análisis a posteriori mediante PCR de la posible recombinación, por el cambio en los tamaños de bandas esperadas. Esta alternativa es más costosa porque supone analizar un alto número de muestras con el consiguiente consumo de tiempo y material (enzimas, *primers*, etc.).

30

Las nuevas técnicas como High speed AFM (*Atomic Force Microscope*) y TIRF-SFM (*Total Internal Reflection Fluorescence* y *Scanning Force Microscope* SFM ó AFM) y otras relacionadas con *Next Generation Sequencing* permiten realizar análisis muy detallados de genomas enteros. Pero suponen disponer de esa metodología y el coste es mucho mayor que la simple visualización de imágenes al microscopio de fluorescencia comparando dos localizaciones sub-celulares.

35

40

### Descripción de la invención

La recombinación homóloga en eucariotas es el proceso mediante el cual dos cadenas de ADN con secuencias altamente conservadas, se combinan entre sí en el núcleo de la célula. Es uno de los principales mecanismos de obtención de variabilidad genética siendo fundamental en la meiosis, pero también en mitosis y en procesos de reparación de alteraciones en el genoma por diferentes causas, incluyendo el daño en el ADN por agentes externos y consecuentemente muy cancerígenos.

45

Presentarnos un sistema que permite detectar recombinación homóloga entre dos genes GFP recombinantes presentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

50

1 - el plásmido pGFPKIPD (construido en nuestro laboratorio) que expresa la región codificadora de GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde) con la

región 3'-UTR (3'-no traducida) del gen *KICYC1*. Fue construido partiendo del plásmido pGFP-N\_FUS (Niedenthal *et al.*, 1996, *Yeast* 12:773-786) sustituyendo la región 3'-UTR del gen *CYC1* (260 pares de bases) por la de *KICYC1* (1194 pares de bases en los sitios *HindIII-SalI*). Esta región 3'-UTR es necesaria para el procesamiento 3' del ARN de *KICYC1* y permite modular la expresión génica (Seoane *et al.*, 2005, *J. Biotechnol* 118:149-156). La secuencia de la región 3'-UTR de *KICYC1* fue divulgada (Freire-Picos *et al.*, 2001, *Yeast* 18:1347-1355).

2 - el gen recombinante RPA190-GFP codifica para una proteína de fusión entre RPA190 y GFP. El gen *RPA190* codifica para la subunidad mayor de la RNA polimerasa I, de localización nucleolar. Por ello la expresión de éste gen híbrido produce una proteína fluorescente de localización nucleolar (Freire-Picos MA *et al.*, 2013, *Yeast* 30: 267-277).

Las células que expresan estas dos formas de GFP presentan un citosol con una fluorescencia verde tenue (debido a la región 3'-UTR de *KICYC1*) y un nucleolo con fluorescencia más intensa, también en verde y claramente distinguible por su morfología en un microscopio de fluorescencia.

La recombinación homóloga entre los dos genes GFP recombinantes presentes en la levadura puede tener dos consecuencias:

- pérdida de la fusión RPA190GFP (nucleolar), y en su lugar se restaura RPA190 (que no emite fluorescencia) y GFP pasa a ser citosólico, por tanto se visualiza sólo fluorescencia citosólica.

- pérdida del GFP plasmídico por integración en el genoma de GFP, esta recombinación se detectaría como pérdida de fluorescencia citosólica.

En la figura 1 se explican tanto los genes como los tipos de recombinación (R) esperables al expresar las distintas combinaciones génicas en levaduras. También se incluye un esquema de la localización de la fluorescencia celular que resultaría en cada caso observable por microscopía de fluorescencia con filtro para GFP.

La recombinación se detecta por la desaparición de GFP (bien nucleolar o bien citosólico) y se cuantifica por el ratio entre el porcentaje de células que pierden la fluorescencia nucleolar y/o citosólica frente al porcentaje de fluorescencia total (N/FT). Este ratio aumenta en las células en las que aumenta la frecuencia de recombinación por la pérdida de fluorescencia. Es importante comparar ese ratio con el de células control no sometidas a factores que afecten a recombinación (Figura 2).

El procedimiento con los dos genes recombinantes dando lugar a las dos formas de GFP con diferente localización sub-celular se puede aplicar a cualquier célula eucariota, incluyendo células vegetales y humanas. Estas últimas aplicaciones tienen cabida en medicina y biotecnología.

La ventaja principal de nuestro procedimiento es que permite identificar la recombinación de forma sencilla, empleando microscopía de fluorescencia y detectando visualmente si se produce la pérdida de GFP nucleolar ó citosólica (según figura 1). La cuantificación se consigue identificando (por microscopía de fluorescencia) y contando visualmente un número discreto de células (20-30) y la comparación con un control negativo que no expresa la forma citosólica de GFP.

La disponibilidad de esta microscopía no implica grandes infraestructuras y de un modo rápido se pueden analizar las frecuencias de recombinación sin tener que hacer extracciones de ácidos nucleicos ni análisis moleculares.

5 Es importante indicar que no se analiza la intensidad de fluorescencia que puede variar dependiendo de las cepas (mutantes o silvestres etc.), sino la posible pérdida de la fluorescencia en una de las dos localizaciones sub-celulares presentes indicando no sólo la recombinación sino también el sentido preferente (la copia plasmídica de GFP pasa a ser genómica o al revés).

10 Nuestro sistema difiere completamente de los anteriores tanto en las características de las cepas como en la utilización de dos formas variantes de GFP no disponibles comercialmente. Permite detectar visualmente cambios individuales en células dentro de una misma población. Así por ejemplo, en un cultivo celular, a partir de una única colonia, se pueden estudiar las frecuencias de recombinación a lo largo del cultivo.

15 Las condiciones de cultivo son las generales para levaduras a una temperatura de 27-30°C, con una agitación de 200-250 rpm, y en un medio completo sin uracilo para asegurar que se mantiene el plásmido. El volumen del cultivo no es crítico (puede ser en matraces de 50 ml o en tubos de cultivo de menor volumen). En función del experimento se pueden aumentar auxotrofias o cambiar la temperatura (por ejemplo causar un estrés a 37°C) pero esto ya depende de la investigación en la que se quiera aplicar nuestro procedimiento.

25 Nuestra tecnología satisfaría la necesidad de poder visualizar y analizar en una población de células vivas el cambio en la frecuencia de recombinación génica muchas veces asociadas a cáncer (en el caso de medicina), por la exposición a un agente químico, medicamento de la industria farmacéutica o en investigaciones con nuevos mutantes cuando se quiera conocer si afectan a recombinación homóloga (investigación básica).

30 La tecnología que proponemos para el análisis de recombinación *in vivo* es aplicable a otras células eucariotas (tanto animales como vegetales) puesto que las células crecerán en su propio sistema.

### 35 **Descripción de las figuras**

Figura 1. Genes GFP recombinantes expresados en dos cepas de levadura isogénicas. A, cepa empleada como control negativo expresando el plásmido sin GFP que no puede recombinar (-R) con la copia genómica de RPA190GFP. B, cepa expresando el plásmido con GFP y la copia genómica de RPA190GFP.

40 Posibles recombinaciones génicas (+R). 1 - la recombinación elimina el GFP plasmídico 2 - la recombinación elimina el GFP genómico. En todos los casos se muestra el esquema de la célula con las localizaciones de GFP esperables. NI: nucleolar. C: citosólico. N+C: nucleolar y citosólico.

Figura 2. Esquema explicativo del procedimiento a seguir. Las células de levadura expresando: las dos formas recombinantes de GFP (a) y un control negativo que no expresa GFP citosólico (b) se cultivan durante 8-12 horas en matraces con medio líquido. El apartado 1 representa a un cultivo en matraz de una cepa silvestre (o no tratada), y el apartado 2 el de una cepa mutada y/o sometida a agentes químicos o cambios ambientales. (c) Comprobación por microscopía de fluorescencia de la localización sub-celular siguiendo los criterios que se indican en la Figura 1. R1 y R2 indican dos posibles sentidos de recombinación potencialmente detectables (como se recoge en la Figura 1).

Figura 3. Cuantificación de los resultados de localización sub-celular de GFP con la puesta en práctica del procedimiento empleando las dos cepas:

5 A - Experimento con la cepa de control negativo expresando el plásmido p-deltaGFP. Sólo se detecta fluorescencia nucleolar (1) por la expresión de RP A 190GFP. No hay fluorescencia exclusivamente citosólica (2).

10 B - Experimento con la cepa expresando además GFP citosólico en el plásmido pGFPKIPD. En este caso se detectó pérdida de fluorescencia nucleolar. Nucleolar = nucleolar\_+ citosólica (1) frente a sólo citosólica (2).

### Descripción de una realización preferente

15 El procedimiento con las dos formas de GFP se puede aplicar a cualquier célula eucariota, incluyendo células vegetales y humanas. Estas últimas aplicaciones tienen cabida en medicina y biotecnología.

Ejemplos de aplicaciones:

20 a - Investigación básica: estudiar, *in vivo*, el aumento de la frecuencia de recombinación causada por la mutación de un tercer gen a estudio para determinar si afecta al proceso de recombinación.

25 b - Investigación medioambiental: estudiar, *in vivo*, el aumento de la frecuencia de recombinación causada por agentes mutágenos potencialmente presentes en medios acuáticos para de este modo, determinar si un determinado compuesto afecta al proceso de recombinación con las subsiguientes consecuencias negativas para las células.

30 c - Farmacológico: efecto de un medicamento en la tasa de recombinación que conlleva un aumento de probabilidades de cáncer.

d - Se puede utilizar para el desarrollo de un software para análisis de imagen que permita llevar a cabo el análisis de modo automático.

35 Hemos aplicado el sistema en levaduras para ver el resultado en una cepa salvaje BY 4741 que expresa la forma recombinante GFP con localización nucleolar (Freire-Picos MA *et al.*, 2013, *Yeast* 30: 267-277) transformada con un plásmido (pGFPKIPD), construido en nuestro laboratorio, que expresa GFP con la región 3'-UTR del gen *KICYC1* y (a causa de esa modificación en la UTR) tiene una expresión débil de GFP. Analizamos  
40 células de un cultivo fresco de cada una de ellas en un medio selectivo para que no se pierda el plásmido. En este caso medio completo CM sin uracilo ('Ura) (Sherman 2002, *Methods Enzymol.* 350: 3-41).

45 Una segunda cepa, basada en la anterior, también expresa la forma nucleolar e incluye un plásmido con una delección de GFP (pdeltaGFP) actuando como control negativo del GFP citosólico (Figura 1). El plásmido pdeltaGFP, se obtuvo en nuestro laboratorio, partiendo del plásmido pGFPCFus (Niedental *et al.*, 1996, *Yeast* 12:773-786) al que se le eliminó la región codificadora de GFP.

50 Se tomaron unos microlitros de los cultivos celulares y se analizaron en un microscopio Nikon con filtro para GFP. El esquema general de trabajo, incluyendo el control negativo, se muestra en la figura 2. Para el conteo fotografiamos células sin fijar que se analizaron detalladamente. También cabe la opción de fijar GFP, pero no es imprescindible. Procedimos al análisis siguiendo el criterio de la figura 1B. En ella se muestran ejemplos

de los tipos celulares estudiados y su interpretación. Los resultados se muestran en los gráficos de la Figura 3 (A y B).

- 5 Conclusiones: el aumento en la fluorescencia citoplasmática respecto al total indica un 10% de recombinación homóloga en la cepa salvaje al expresar los dos genes GFP recombinantes. El control negativo permite comprobar que la cepa que sólo expresa RPA190-GFP da fluorescencia exclusivamente nucleolar.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* **caracterizado** por utilizar células eucariotas que expresan dos formas de la proteína GFP: GFP fusionada a una proteína de localización nucleolar y GFP citosólica atenuada, ésta última gracias al gen GFP incluido en un plásmido con la 3'-UTR de *KICYC1* que disminuye su nivel de expresión citosólica.
- 10 2. Procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* con formas de GFP recombinantes según reivindicación 1 **caracterizado** por estudiar la recombinación entre los genes que codifican para estas dos formas de GFP en el transcurso de un cultivo celular, donde éstas células son levaduras.
- 15 3. Procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* con formas de GFP recombinantes según reivindicación 1 y 2 **caracterizado** porque la recombinación se comprueba por la desaparición de la fluorescencia de GFP de una de las dos localizaciones sub-celulares frente al mantenimiento de la otra: es decir, pérdida del GFP nucleolar frente al mantenimiento del citosólico o bien por el incremento de GFP nucleolar frente a la pérdida del citosólico que se detecta por microscopía óptica de fluorescencia y  
20 que también se puede aplicar a células fijadas.
- 25 4. Procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* con formas de GFP recombinantes según reivindicaciones 1, 2 y 3 **caracterizado** por un control negativo, una cepa expresando el plásmido pdeltaGFP, (sin fluorescencia citosólica) y construido por delección de GFP en el mismo vector que el anterior. Este control permite descontar cualquier efecto de fondo al visualizar las células en el microscopio.
- 30 5. Uso del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la detección de recombinación homóloga *in vivo* aplicado en mutantes de levadura para comprobar su efecto en la tasa de recombinación, ó en levaduras silvestres cultivadas en presencia de compuestos potencialmente tóxicos que puedan aumentar la tasa de recombinación.
- 35 6. Uso del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la detección de recombinación homóloga *in vivo* en cultivos de otras células eucariotas, incluidas las humanas.

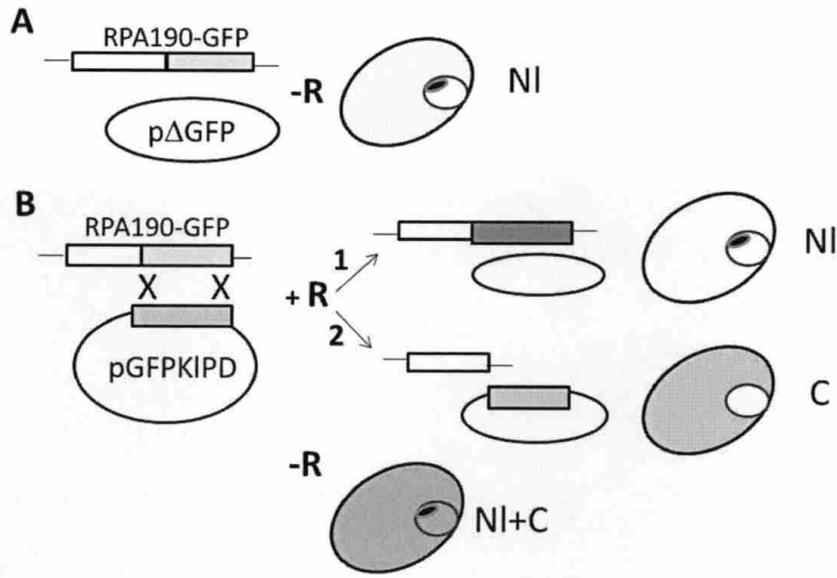


Figura 1

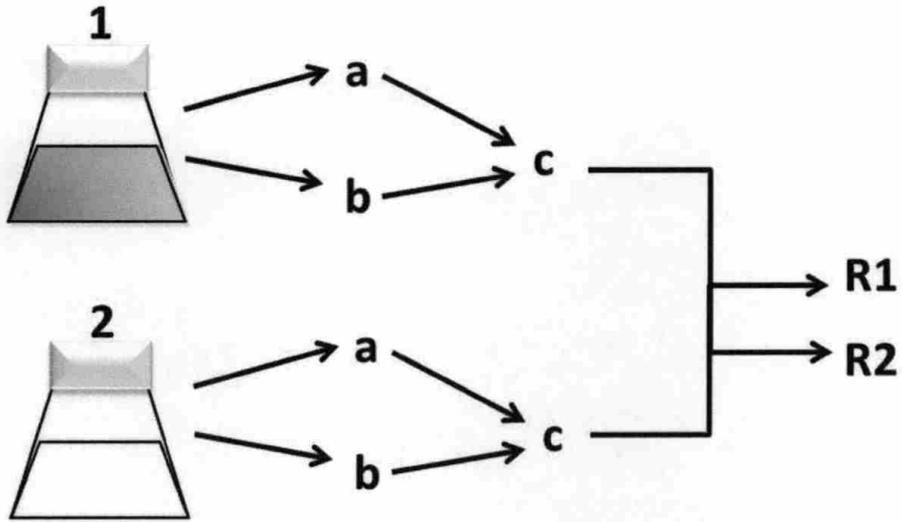


Figura 2

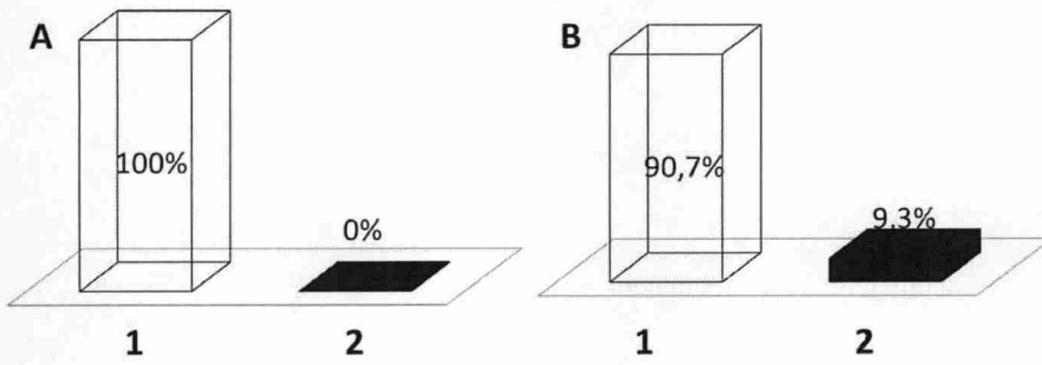


Figura 3



②① N.º solicitud: 201500093

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DREXLER, G. A. et al. The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein. DNA Repair. Octubre 2004, Vol. 3, Nº 10, páginas: 1345-1353. ISSN 1568-7864. <Doi:10.1016/j.dnarep.2004.05.001>	1-6
A	US 20040197855 A1 (WIESMULLER LISA) 07.10.2004, párrafos [0001],[0105-0109]; ejemplos 1-4; figuras 1-3.	1-6
A	SLEBOS, R. J. C. et al. A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications. Febrero 2001, Vol. 281, Nº 1, páginas: 212-219. ISSN 0006-291X. <Doi:10.1006/bbrc.2001.4335>	1-6
A	HENDRICKS, C. A. et al. Spontaneous mitotic homologous recombination at an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) cDNA direct repeat in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Mayo 2003, Vol. 100, Nº 11, páginas: 6325-6330. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.1232231100>	1-6
A	DERE, R. et al. DM2 CCTG*CAGG repeats are crossover hotspots that are more prone to expansions than the DM1 CTG*CAG repeats in <i>Escherichia coli</i> . Journal of Molecular Biology. Junio 2006, Vol. 360, Nº 1, páginas: 21-36. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2006.05.012>	1-6
A	FREIRE-PICOS, M. A. et al. Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. Yeast. Julio 2013, Vol. 30, Nº 7, páginas: 267-277. ISSN 0749-503X (impreso) ISSN 1097-0061(electrónico). <Doi:10.1002/yea.2961>	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
22.03.2016

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2006.01)

**C12N15/62** (2006.01)

**C12N15/81** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, XPOAC, NPL, COMPENDEX, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.03.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DREXLER, G. A. et al. DNA Repair. Octubre 2004, Vol. 3, Nº 10, páginas: 1345-1353.	05.10.2004
D02	US 20040197855	07.10.2004
D03	SLEBOS, R. J. C. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications. Febrero 2001, Vol. 281, Nº 1, páginas: 212-219.	16.02.2001
D04	HENDRICKS, C. A. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Mayo 2003, Vol. 100, Nº 11, páginas: 6325-6330.	27.05.2003
D05	DERE, R. et al. Journal of Molecular Biology. Junio 2006, Vol. 360, Nº 1, páginas: 21-36.	30.06.2006
D06	FREIRE-PICOS, M. A. et al. Yeast. Julio 2013, Vol. 30, Nº 7, páginas: 267-277.	07.2013

D01 y D02 divulgan sendos procedimientos de detección de recombinación homóloga, que comprenden la transfección de una célula eucariota con un plásmido de expresión que incluye la secuencia codificante de dos proteínas verdes fluorescentes (EGFP) mutadas no funcionales. En las células en las que se produce la recombinación homóloga entre ambas secuencias, se recupera la EGFP funcional, emitiendo la célula fluorescencia.

En D03 se desarrolla un método para detectar recombinación homóloga en células eucarióticas, que comprende transfectarlas con un plásmido de expresión que comprende la secuencia codificante para una proteína azul fluorescente (EBFP) y una secuencia truncada de la EGFP. Cuando se produce recombinación homóloga entre ambas proteínas, hay un cambio en el color de la fluorescencia de azul a verde.

En D04 se obtiene un ratón transgénico que presenta integrado en su genoma, una estructura génica con dos secuencias codificantes para la proteína amarilla fluorescente (EYFP), una con una delección en el extremo 5' y otra con una delección en el extremo 3'. La recombinación homóloga entre ambas secuencias conlleva la recuperación de la EYFP funcional y la emisión de fluorescencia.

D05 describe un método de determinación de la frecuencia de recombinación homóloga en *Escherichia coli* mediante su transformación con un plásmido de expresión, que comprende la secuencia codificante para la GFP entre dos secuencias nucleotídicas repetidas. La recombinación homóloga entre ambas secuencias, produce la pérdida de la GFP, cambiando el color de las colonias a blanco.

En D06 se anticipan cepas de levadura que expresan la proteína de fusión RPA190-GFP, de localización nucleolar.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud tiene por objeto, un procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo* en levaduras, caracterizado por utilizar una levadura que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a una proteína de localización nucleolar, y que está transfectada con un plásmido que comprende la secuencia codificante para otra GFP cuya expresión está controlada por la región 3' UTR de *KICYC1*, lo que disminuye el nivel de expresión de esta última GFP (reivindicaciones 1 y 2). De este modo, la célula expresa de manera atenuada una GFP en el citoplasma, y otra GFP con mayor intensidad en el nucleolo. La recombinación homóloga produce la pérdida de fluorescencia o en el citoplasma o en el nucleolo, lo que se detecta mediante microscopía de fluorescencia (reivindicación 3). Como control negativo de la recombinación, se utiliza una levadura que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a una proteína de localización nucleolar, y transfectada con el mismo plásmido utilizado en el procedimiento, pero sin la secuencia codificante para la GFP (reivindicación 4). Este método se utiliza en la detección de recombinación homóloga *in vivo* en células eucariotas, o en el estudio del efecto de determinadas mutaciones o del cultivo con compuestos potencialmente tóxicos en levaduras (reivindicaciones 5 y 6).

## NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 LP 11/1986)

El objeto de la reivindicación 1, es un procedimiento para la detección de recombinación homóloga *in vivo*, caracterizado por utilizar células eucarióticas que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a una proteína de localización nucleolar, y que están transfectadas con un plásmido que comprende la secuencia codificante para otra GFP, cuya expresión está controlada por la región 3' UTR de *KICYC1*, lo que disminuye el nivel de expresión de esta última GFP.

Hay numerosos documentos que divulgan métodos de detección de recombinación homóloga *in vivo* basados en la ganancia, pérdida o alteración de la fluorescencia de proteínas fluorescentes, tras producirse el fenómeno de la recombinación homóloga en sus secuencias codificantes.

Así, tanto en D01 como en D02, se transfectan células eucariotas con un plásmido de expresión que comprende dos copias no funcionales de la EGFP. La recombinación homóloga entre ambas secuencias produce la recuperación de la proteína y por lo tanto, la emisión de fluorescencia en la célula.

D03 desarrolla un método para detectar recombinación homóloga en células eucariotas, que comprende transfectarlas con un plásmido de expresión que comprende la secuencia codificante para una proteína azul fluorescente (EBFP) y una secuencia truncada de la EGFP. Ambas secuencias tienen una región homóloga de 300 pb, lo que permite la recombinación homóloga entre ellas. En caso de no haber recombinación, se detecta la fluorescencia de color azul de la EBFP. Sin embargo, cuando se produce recombinación homóloga entre ambas secuencias, se restaura la secuencia de la EGFP y se inactiva la EBFP, emitiendo la célula fluorescencia de color verde.

En D04 se obtiene un ratón transgénico que presenta integrado en su genoma una estructura génica con dos secuencias codificantes para la proteína amarilla fluorescente (EYFP), una con una delección en el extremo 5' y otra con una delección en el extremo 3'. La recombinación homóloga entre las dos secuencias produce la recuperación de la EYFP funcional, lo que se puede medir mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

Por lo tanto, aunque los documentos D01 a D04 muestran métodos para detectar recombinación homóloga basados en proteínas fluorescentes, en ninguno de ellos se utiliza la presencia de dos señales fluorescentes de diferente intensidad y localización celular (citoplasma y nucléolo) como base para determinar la presencia de dicha recombinación.

Además, aunque D06 anticipa una cepa de levadura que expresa la secuencia de la proteína de fusión y de localización nucleolar RPA190-GFP, este documento no induce al experto en la materia a su aplicación en experimentos de recombinación.

En consecuencia, se entiende que el objeto de la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 2 a la 4 son dependientes de la reivindicación 1, y como ésta presentan novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Al ser nuevo el procedimiento de la invención, su uso en la detección de recombinación homóloga *in vivo* en células eucariotas (reivindicación 6), o en el estudio del efecto de determinadas mutaciones o del cultivo con compuestos potencialmente tóxicos en levaduras (reivindicación 5) también tiene novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).