(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 633 751**

(21) Número de solicitud: 201600166

(51) Int. CI.:

C12N 15/79 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

23.02.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

25.09.2017

Fecha de concesión:

06.06.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

13.06.2018

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/000019

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE HUELVA (100.0%)
Dr. Cantero Cuadrado nº 6
21071 Huelva (Huelva) ES

(72) Inventor/es:

LEÓN BAÑARES, Rosa y
VILA SPÍNOLA, Marta

(54) Título: **Plásmido y procedimiento de expresión de una proteína en microalgas**

(57) Resumen:

Plásmido y procedimiento de expresión de una proteína en microalgas. Plásmido para expresar una proteína, que comprende un gen que codifica para dicha proteína y el casete identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1, donde dicho casete comprende el promotor híbrida pHSP70A/RbcS2 de Chlamydomonas, la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fostotransterasa (APHVIII). Procedimiento de expresión de una proteína en microalgas, que comprende transformar dicha microalga con un plásmido y expresar dicha proteína y la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa (APHVIII), donde dicha proteína se separa de la enzima APHVIII tras autohidólisis del péptido autohidrolizable FMDV 2A.

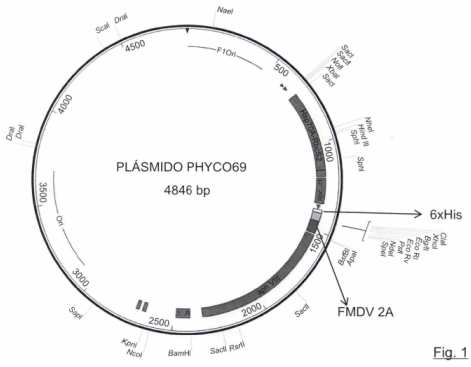


Fig. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 633 751 B1

PLÁSMIDO Y PROCEDIMIENTO DE EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA EN MICROALGAS

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención está en el campo técnico de la obtención de proteínas de interés en un huésped, donde dicho huésped es una microalga eucariota. Dicha microalga puede ser de un género de la división de las clorofitas. En concreto, la presente invención se refiere a un plásmido y la utilización de este plásmido en un procedimiento de expresión de una proteína en microalgas. El plásmido comprende una fusión que comprende un gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A de *Foot and mouth disease virus* y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (APHVIII).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las microalgas son un grupo heterogéneo de microorganismos, mayoritariamente fotosintéticos, con gran importancia ecológica y con un enorme potencial biotecnológico, cuyo uso para la producción a gran escala de carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y otros compuestos de alto valor añadido está bien establecido. Más aún, en los últimos años, ha habido un creciente interés en las microalgas como posible materia prima para una tercera generación de biocombustibles de tercera generación con un balance neutro de carbono. Esto ha incrementado el interés sobre la ingeniería genética de microalgas como posible herramienta para conseguir la producción económicamente viable de materias primas y para aumentar la productividad de compuestos de alto valor añadido. Sin embargo la manipulación genética de microalgas ha estado hasta ahora limitada a un bajo número de especies.

Se estima que el número de especies de microalgas oscila entre 300.000 y un millón de especies, de las cuales aproximadamente 30.000 se han clasificado y estudiado y menos de 20 se han transformado genéticamente con éxito. La mayoría del trabajo sobre la manipulación genética se ha centrado en las especies clásicas como *Chlamydomonas reinhardtii* o *Phaeodactylum tricornutum,* que no son siempre las de mayor interés aplicado.

La falta de promotores endógenos y otras regiones regulatorias es uno de los principales problemas para la manipulación genética de nuevas especies de microalgas, pero incluso

cuando se cuenta con esos elementos, la baja eficiencia y la inestabilidad en la expresión de los transgenes son todavía problemas usuales.

Los genes selectivos más utilizados en la manipulación de microalgas son los que confieren resistencia a antibióticos como bleomicina (BLE), streptomicina (AADA) y paromomicina (*APHVIII*), o a herbicidas, como el gen acetoliasa sintasa (ALS), que confiere resistencia al herbicida silfonilurea, o el gen BAR que confiere resitencia al herbicida fosfinotricina (PPT).
En cuanto a los promotores, su elección es, como se ha indicado, crítica para el desarrollo de un sistema de transformación eficiente. Promotores como el de la subunidad pequeña de la ribilosa bifosfato carboxilasa de *Chlamydomonas* (RbcS2) se han utilizado con éxito en *Chlamydomonas* y otras clorofitas como *Chlorella ellipsoidea* o *Volvox cateri*.

La existencia de péptidos autoprocesables, como el péptido 2A del virus FMDV (*foot and mouth desease virus*) se conoce desde hace tiempo. El péptido, de tan solo 24 aminoácidos, se hidroliza espontáneamente por el enlace peptídico que une los aminoácidos Gly23 y Pro24. La posibilidad de utilizar este pequeño péptido FMDV 2A como una estrategia para expresar dos genes bajo el mismo promotor y luego gracias a su capacidad de autoprocesamiento obtener los dos productos génicos independientes se ha utilizado en varios sistemas eucariotas como células de mamífero y plantas o en terapia génica.

Recientemente se ha demostrado su funcionamiento en microalgas (Rasala, B.A. et al. Robust expression and secretion of xylanasae1 in C. reinhardtii by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. PLoS One 2012; 7(8): e43349). Este documento describe la fusión del gen de resistencia a bleomicina (BLE) con el gen de la xilanasa de *Trichoderma reesei* mediante el pequeño péptido autohidrolizable (FMDV 2A) y demostraron la obtención de las dos proteínas de forma independiente, la proteína de unión a bleomicina (BLE) y la xilanasa. Más aún, concluyen que ésta fusión permite obtener transformantes con altos niveles de xilanasa. Pero el antibiótico de selección que utilizan, bleomicina, tiene como principal inconveniente su alto poder mutagénico y bajas eficiencias de transformación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El problema en vista del estado de la técnica más cercano puede definirse como la aportación de un plásmido y procedimiento para transformar microalgas con alta eficiencia de transformación y expresar proteínas de interés en dichas microalgas.

La solución a este problema consiste en proporcionar un plásmido y procedimiento definido por las reivindicaciones de la presente solicitud.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un plásmido para expresar una proteína, que comprende un gen que codifica para dicha proteína y el casete pHSP70A-RbcS2-6xHis-PLK-FMDV2A-APHVIII-3´UTR identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1, donde dicho casete comprende:

- el promotor híbrido pHSP70A/RbcS2 de *Chlamydomonas*,
- la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A de *Foot and mouth disease virus* y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (APHVIII).

Un segundo aspecto es el primer aspecto de la presente invención, donde dicho plásmido está identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

El plásmido del primer o segundo aspecto de la invención soluciona los problemas planteados en el estado de la técnica porque ofrece un procedimiento para la expresión de altas cantidades de la proteína de interés y mejor eficiencia de transformación.

El plásmido del primer o segundo aspecto de la invención contiene la fusión traduccional del gen de interés con el gen de resistencia a paromomicina, que carece de los efectos mutagénicos de otros antibióticos y permite, gracias al péptido autohidrolizable FMDV 2A, la obtención independiente de la proteína de interés y la proteína de resistencia a antibiótico.

Además, el plásmido del primer o segundo aspecto de la invención permite la fusión del péptido FMDV2A por el extremo amino de la aminoglicósido 3`fosfotransferasa, con lo que se evitan las interferencias del pequeño fragmento resultante de la autolisis del péptido FMDV2A ejerce sobre la actividad antibiótica de la aminoglicósido 3`fosfotransferasa.

El péptido FMDV 2A permite la autohidrólisis de las dos proteínas una vez formadas, a partir del mismo transcrito común, pero utiliza como gen seleccionable el gen *APHVIII*, que codifica la enzima aminoglicósido 3`fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* y confiere resistencia al antibiótico paromomicina. Intentos previos para fusionar proteínas con gen *APHVIII* no han tenido éxito, ya que este gen parece perder su funcionalidad cuando se le adicionan péptidos al extremo carboxilo final.

El plásmido del primer o segundo aspecto de la invención contiene el gen que codifica la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (*APHVIII*), que confiere resistencia al antibiótico paromomicina, unido por su extremo amino terminal con una región de policlonaje a través de un péptido autohidrolizable, como el péptido FMDV 2A del foot and mouth desease virus.

Esto permite la inserción y expresión de forma coordinada con el gen de resistencia al antibiótico de cualquier gen de interés. Además precediendo a la región de policlonaje hemos introducido un epítopo, fácilmente detectable mediante técnicas inmunoquímicas, y todo el cassette está bajo el control del promotor híbrido el RbcS2/HSP70A de *Chlamydomonas* (Fig. 1; Fig. 2). La posición relativa de los promotores respecto al polilinker y todos los elementos del plásmido han sido optimizados, eliminando nucleótidos no necesarios, para mejorar la expresión y conseguir así incrementar la eficiencia de la transformación hasta 3 veces con respecto a otros plásmidos que tienen el mismo promotor.

Como el gen de resistencia a antibiótico (*APHVIII*) y el gen de interés se expresan bajo el control del mismo promotor, el cribado con cantidades crecientes del antibiótico paromomicina proporciona un método sencillo para seleccionar los transformantes con más alto nivel de expresión del gen *APHVIII* y consecuentemente del gen de nuestro interés.

La presente invención evita el uso del gen *BLE*, de resistencia a bleomicina, que ha demostrado ser altamente mutagénico e introduce alteraciones no deseables a los transformantes aislados. Además la colocación de la región de policlonaje en el extremo amino soluciona los problemas para fusionar secuencias proteícas al extremo carboxilo de la proteína aminoglicósido 3'fosfotransferasa. Hemos podido comprobar que incluso pequeños péptidos como el péptido autoprocesable FMDV 2A interfieren con la funcionalidad de la aminoglicósido 3'fosfotransferasa si estos son unidos a su extremo carboxilo terminal.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de expresión de una proteína en microalgas, que comprende:

(a) transformar dicha microalga con un plásmido según la reivindicación 1 ó 2,

(b) expresar dicha proteína y la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A de *Foot and mouth disease virus* y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (APHVIII), donde dicha proteína se separa de la enzima APHVIII tras autohidólisis del péptido autohidrolizable FMDV 2A.

Un cuarto aspecto es el procedimiento del tercer aspecto de la invención, donde dicha microalga es es una microalga de un género de la división de las clorofitas.

Preferiblemente, dicha microalga es del género *Chlamydomonas* o *Phaeodactylum.*

Más preferiblemente, dicha microalga es *Chlamydomonas reinhardtii.*

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

A continuación se aporta una traducción del texto libre en inglés que aparece en la lista de secuencias.

SEQ ID NO: 1. Secuencia parcial del plásmido Phyco69; casete pHSP70A-RbcS2-6xHis-PLK-FMDV2A-APHVIII-3´UTR
1..460 HSP70A-RbcS2
506..650 RbcS2 intrón 1
687..704 6xHis
705..752 Polilinker
753..824 FMDV2A
834..1637 APHVIII
SEQ ID NO: 2. Secuencia completa del plásmido Phyco69
696..1155 HSP70A-RbcS2
1201..1345 RbcS2 intrón 1
1382..1399 6xHis
1400..1447 Polilinker
1448..1519 FMDV2A
1529..2332 APHVIII

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del plásmido Phyco69 con indicación de los principales sitios de restricción.

Figura 2. Detalle de los componentes principales del plásmido Phyco69.

Figura 3. Comparación de la eficiencia del plásmido pSI103 (A) y Phyco69 (B). Primera fila, resultados utilizando 200 ng de cada plásmido. Segunda fila, resultados utilizando 500 ng de cada plásmido. Tercera fila, resultados utilizando 1 µg de cada plásmido.

Figura 4. Representación esquemática del plásmido Phyco69-ARS, con indicación de los principales sitios de restricción.

Figura 5. Resultados de RT-PCR mediante inmunodetección con anticuerpos monoclonales comerciales anti-poli Histidina-fosfatasa alcalina (SIGMA), que se unen a la proteína ARS2, con un peso molecular de 77425 daltons, y a la proteína fusión ARS2-APHVIII, con un peso molecular de 106,000 daltons.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

EJEMPLO 1. Transformación de la microalga eucariota *C. reinhardtii* con el plásmido Phyco69

El plásmido para la expresión de proteínas exógenas en microalgas eucariotas mediante fusión traduccional con el gen marcador seleccionable *APHVIII* se ha denonimado Phyco69.

En este ejemplo se describe la transformación de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* con el plásmido Phyco69 y la frecuencia de transformación observada para este plásmido en comparación con otros plásmidos que contienen el mismo gen marcador selectivo, como el pSI103.

La estirpe 704 de *Chlamydomonas reinhardtii*, que carece de pared celular, fue adquirida en el Culture Collection of Algae at the University of Texas (UTEX, Austin, TEX, USA) y mantenida en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP), preparado según descrito en Harris (2009).

El plásmido Phyco69 y el plásmido pSI103 se conservaron en *E. coli* con glicerol 15% a -80°C para su mantenimiento y propagación. El plásmido pSI103 ha sido descrito en el documento Sizova, I. et al. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. Gene 2001; 277: 221-229.

Los plásmidos se obtuvieron a partir de las correspondientes bacterias por los clásicos métodos de aislamiento de ADN plasmídicos basados en separación con columnas de sílice.

Las células de *C. reinhardtii* se dejaron crecer hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de $1.6x10^6$ células mL^{-1}), fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio TAP fresco para obtener una suspensión celular 100 veces concentrada.

Cantidades crecientes, comprendidas entre 0,2 y 2 µg, de cada plásmido se añadieron a diferentes tubos de 15 mL con 0.6 mL de la suspensión celular concentrada 100 veces, 0.1 mL de PEG 8000 al 20% y 0,3 gr de perlas de vidrio. Cada tubo se agitó enérgicamente durante 8 segundos (el tiempo de agitación puede variar según la especies a transformar). Las células transformadas se resuspendieron en 50 mL de medio Tris Acetato fosfato (TAP) estéril y se incubaron toda la noche en la cámara de cultivo. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad. Después de esta incubación en ausencia de antibiótico, el cultivo se recogió por centrifugación y las células precipitadas se resuspendieron en 0.8 mL de medio de cultivo y se inocularon en placas con medio TAP sólido y el correspondiente antibiótico, en este caso paromomicina (30 µg ml^{-1}). Las colonias de microalgas transformadas son visibles tras 5-7 días de cultivo (Fig. 3).

El número de transformantes obtenido para las distintas concentraciones de plásmido fue el indicado en la Tabla I

Tabla I. Frecuencia de la transformación de *C. reinhardtii* para distintas cantidades de plásmidos

Plásmido	200 ng	500ng	1 µg	2 µg
Phyco69	98	215	380	820
pSI103	28	60	140	250

Cada transformación se hizo por triplicado, siendo los valores indicados la media de tres repeticiones.

El número de transformantes obtenido para ambos plásmidos es mayor con mayores cantidades de ADN. En todos los casos el número de transformantes fue mucho mayor para

el plásmido Phyco69, objeto de esta patente, obteniéndose frecuencias de transformación 3 veces superiores a las obtenidas con el plásmido estándar pSI103.

EJEMPLO 2. Clonación y expresión del gen ARS de *Chlamydomonas reihardtii* en la microalga eucariota *C. reinhardtii* con el plásmido Phyco69

En este ejemplo se describe la clonación del gen ARS, que codifica la enzima arilsulfatasa, cuya actividad enzimática puede ser fácilmente ensayada con un substrato cromogénico en el plásmido Phyco69, objeto de esta patente y su expresión en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se obtuvo un fragmento de ADN correspondiente al ARN mensajero del gen ARS de *Chlamydomonas reinhardtii*. El fragmento se diseñó para contener sitios de corte para las enzimas XhoI y NdeI y carecer de codón de parada. Además se diseñó para que al introducirlo entre los sitios de corte XhoI y NdeI del polilinker del plásmido Phyco69 quedara en la misma fase de lectura que el gen *APHVIII*.

El plásmido Phyco69-ARS se utilizó para transformar la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* estirpe 704, mediante el método de agitación con perlas de vidrio tal como se describe en el ejemplo anterior.

La estirpe 704 de *Chlamydomonas reinhardtii*, que carece de pared celular, fue adquirida en el Culture Collection of Algae at the University of Texas (UTEX, Austin, TEX, USA) y mantenida en medio TAP.

Las células de *C. reinhardtii* se dejaron crecer hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de $1.6x10^6$ células mL^{-1}), fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio TAP fresco para obtener una suspensión celular 100 veces concentrada.

Aproximadamente 1 µg del plámido Phyco69-ARS se añadió a un tubo eppendorf que contenía 0.6mL de la suspensión celular concentrada, 0.1 mL de PEG 8000 y una pequeña cantidad de perlas de vidrio. El tubo se agitó enérgicamente durante 8 segundos.

Las células transformadas se resuspendieron en 50 mL de medio Tris Acetato fosfato (TAP) estéril y se incubaron toda la noche en la cámara de cultivo. Después de esta incubación en

ausencia de antibiótico, el cultivo se recogió por centrifugación y las células precipitadas se resuspendieron en 0.8 mL de medio de cultivo y se inocularon en placas con medio TAP sólido y el correspondiente antibiótico, en este se hicieron 4 reacciones de transformación que se plaquearon sobre placas con concentraciones de paromomicina de 50, 100, 150 y 200 $\mu g\ mL^{-1}$. Las colonias de microalgas transformadas son visibles tras 5-7 días de cultivo. El número de transformantes disminuía a medida que las concentraciones de antibiótico eran más restrictivas, se eligieron los dos transformantes que fueron aparecieron a mayor concentración de antibiótico.

La correcta inserción tanto del gen selectivo, *APHVIII*, como del gen de nuestro interés ARS en el genoma se chequeó mediante PCR y su correcta transcripción y traducción se comprobó mediante RT-PCR a partir de RNA mensajero y mediante inmunodetección con anticuerpos monoclonales comerciales anti-poli Histidia-fosfatasa alcalina (SIGMA), que se unen a la proteína ARS2, con un peso molecular de 77,425 daltons, y a la proteína fusión ARS2-APHVIII, con un peso molecular de 106,000 daltons (Fig. 4).

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido para expresar una proteína, caracterizado por que comprende un gen que codifica para dicha proteína y el casete pHSP70A-RbcS2-6xHis-PLK-FMDV2A-APHVIII-3´UTR identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1, donde dicho casete comprende:
   - el promotor híbrido pHSP70A/RbcS2 de *Chlamydomonas*,
   - la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A de *Foot and mouth disease virus* y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (APHVIII).
2. Plásmido según la reivindicación 1, identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.
3. Un procedimiento de expresión de una proteína en microalgas, que comprende:
   (a) transformar dicha microalga con un plásmido según la reivindicación 1 ó 2,
   (b) expresar dicha proteína y la fusión del gen que codifica para el péptido autohidrolizable FMDV 2A de *Foot and mouth disease virus* y el gen que codifica para la enzima aminoglicósido 3'fosfotransferasa de *Streptomyces rimosus* (APHVIII), donde dicha proteína se separa de la enzima APHVIII tras autohidólisis del péptido autohidrolizable FMDV 2A.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que dicha microalga es una microalga de un género de la división de las clorofitas.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha microalga es del género *Chlamydomonas.*
6. Plásmido según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha microalga es *Chlamydomonas reinhardtii.*

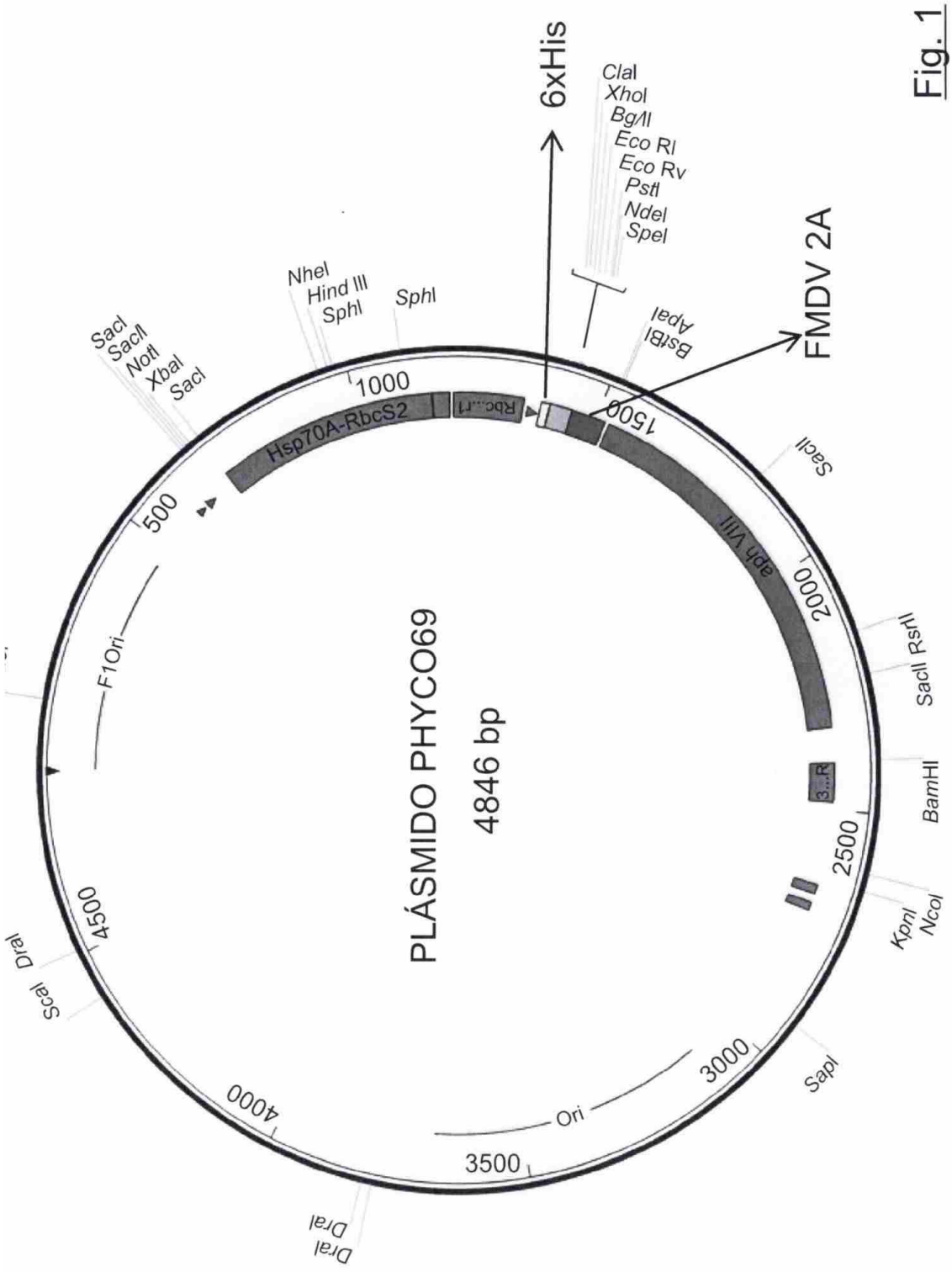

PLÁSMIDO PHYCO69
4846 bp
6xHis
FMDV 2A
ClaI
XhoI
BglII
Eco RI
Eco RV
PstI
NdeI
SpeI
BstBI
ApaI
NheI
Hind III
SphI
SphI
SacI
SacII
NotI
XbaI
SacI
Hsp70A-RbcS2
aph VIII
SacII
SacII RstII
BamHI
KpnI
NcoI
SapI
Ori
DraI
DraI
ScaI
DraI
F1Ori
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

Fig. 1

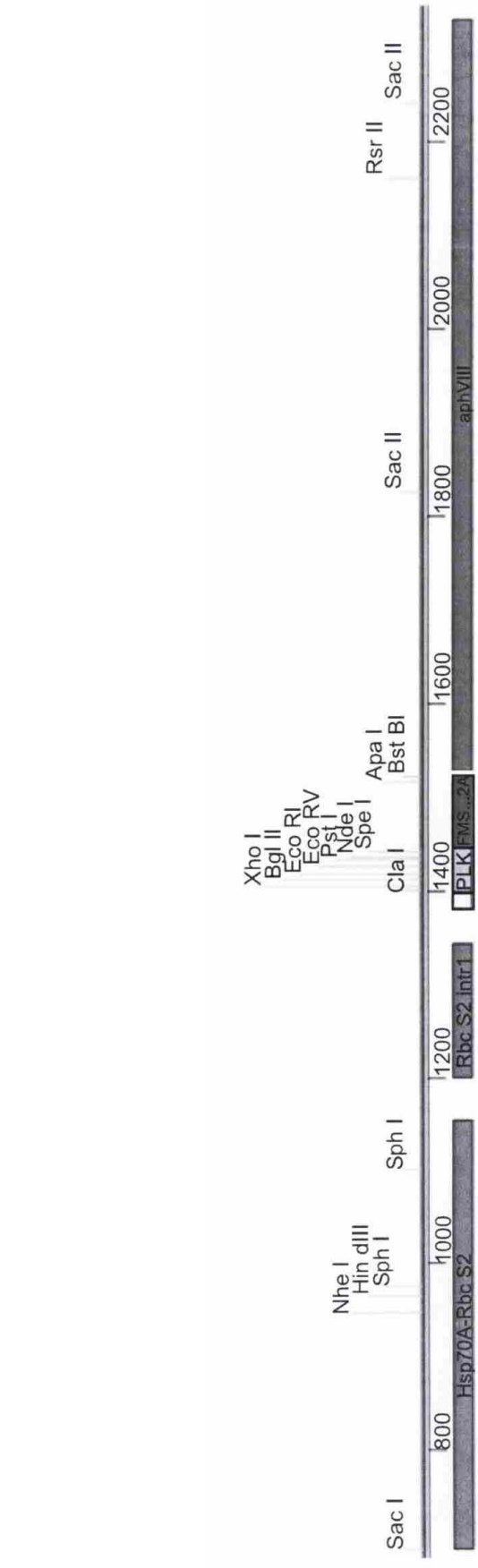

Sac I
800
Hsp70A-Rbc S2
Nhe I
Hin dIII
Sph I
Sph I
1000
1200
Rbc S2 intr1
Xho I
Bgl II
Eco RI
Eco RV
Pst I
Nde I
Spe I
Cla I
Apa I
Bst BI
1400
PLK
FMS...2A
1600
Sac II
1800
aphVIII
2000
Rsr II
Sac II
2200

Fig. 2

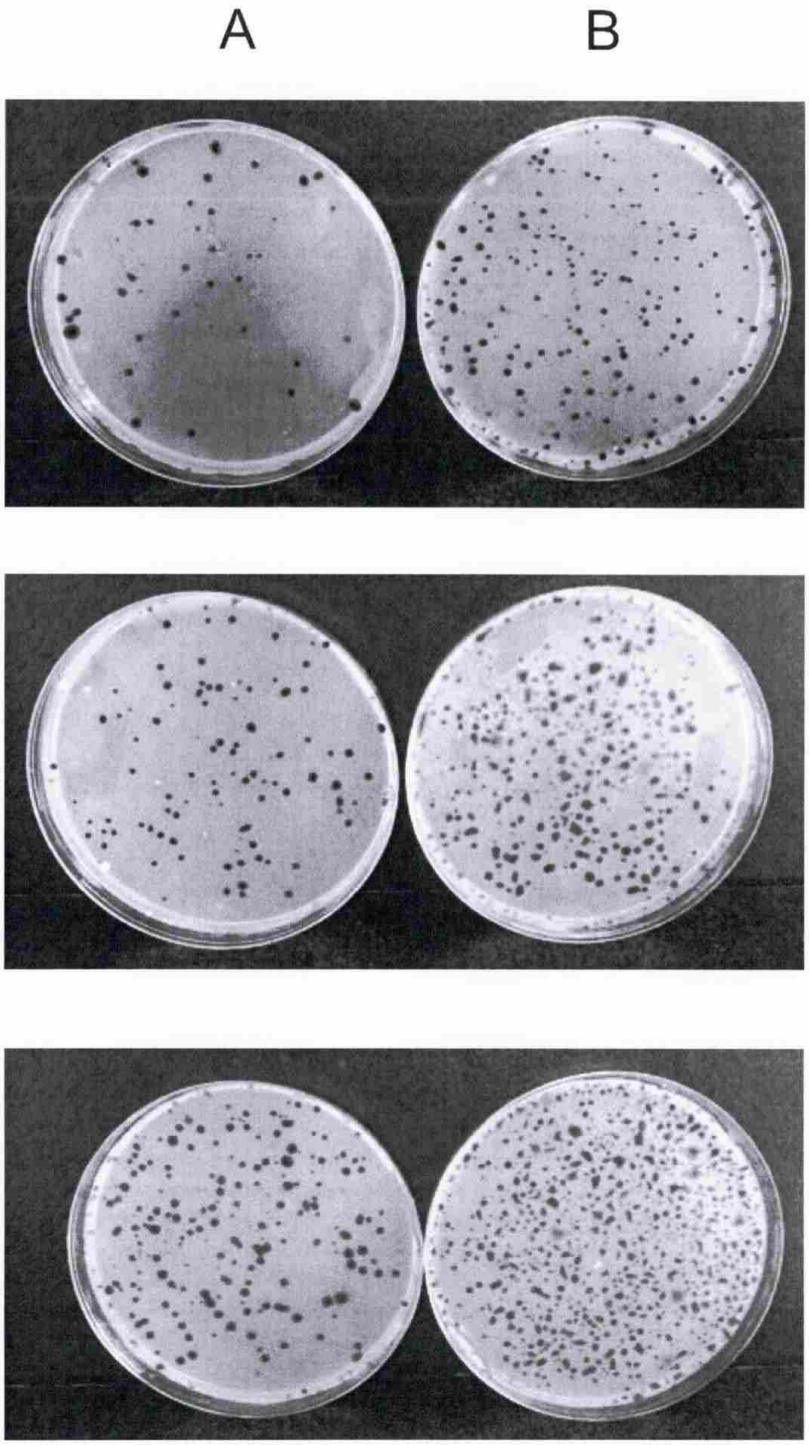
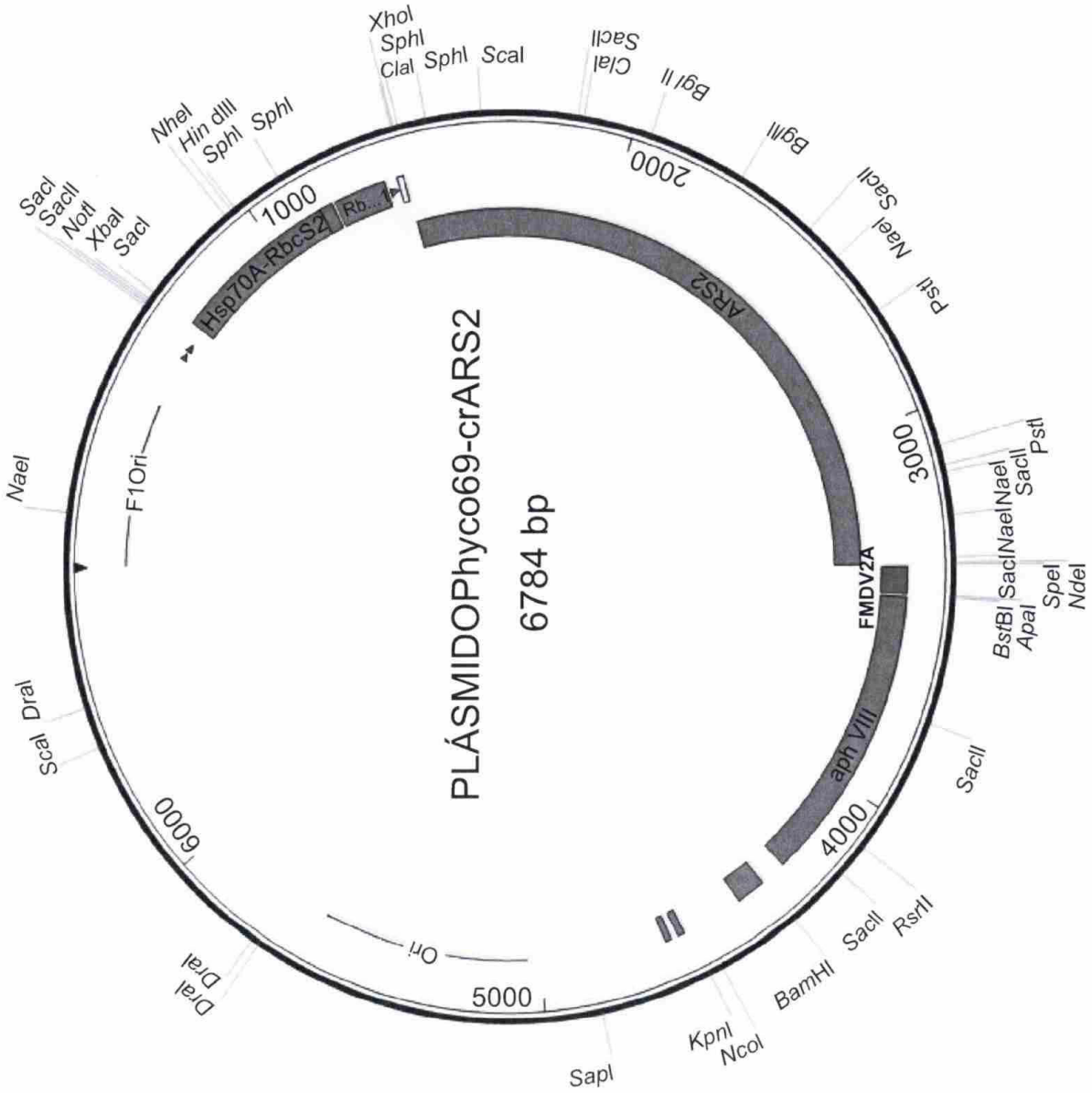


Fig. 3

Fig. 4


PLÁSMIDOPhyco69-crARS2
6784 bp
Hsp70A-RbcS2
Rb...
ARS2
FMDV2A
aph VIII
Ori
F1Ori
1000
2000
3000
4000
5000
6000
XhoI
SphI
ClaI
SphI
ScaI
ClaI
SacII
BglII
BglII
NaeI
SacII
PstI
NheI
HindIII
SphI
SphI
SacI
SacII
NotI
XbaI
SacI
NaeI
ScaI
DraI
DraI
DraI
SapI
KpnI
NcoI
BamHI
SacII
RsrII
SacII
BstBI
ApaI
SacI
NaeI
SacII
PstI
SpeI
NdeI

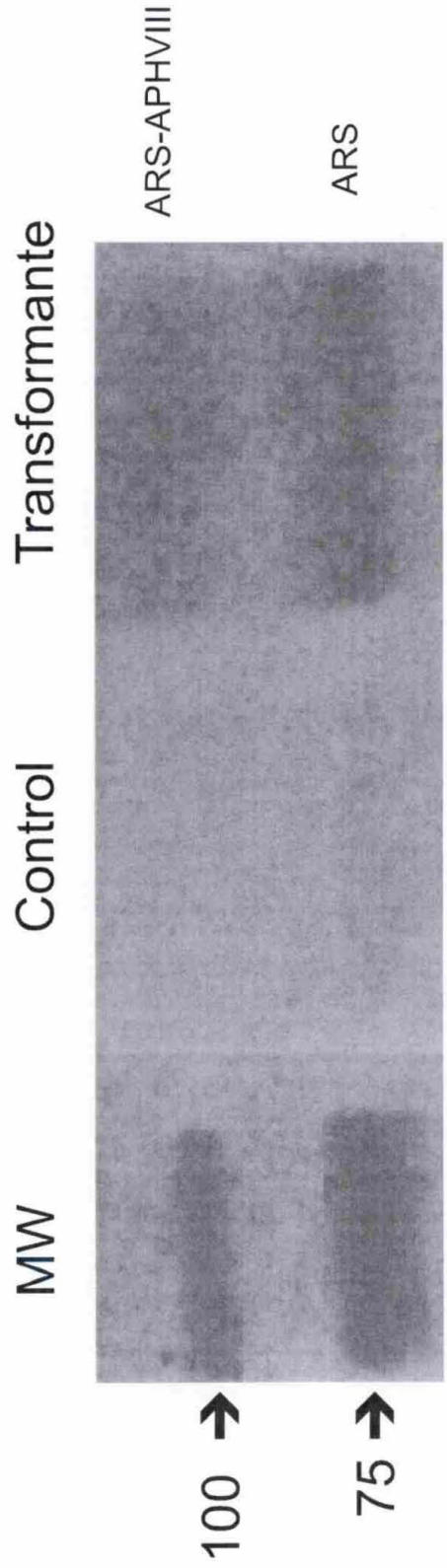


Fig. 5