

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 209 572**

21 Número de solicitud: 200101494

51 Int. Cl.7: **C07K 14/415**

C12N 9/10

C12N 15/29

C12N 5/14

C12N 5/16

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **28.06.2001**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

Fecha de la concesión: **29.09.2005**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.10.2005

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Morán Juez, José Fernando;
Iturbe-Ormaetxe Vivanco, Iñaki;
Heras Heras, Begoña;
Matamoros Galindo, Manuel y
Becana Ausejo, Manuel**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Polipéptido con actividad homoglutación sintetasa.**

57 Resumen:

Polipéptido con actividad homoglutación sintetasa. La presente invención describe la obtención de una nueva proteína con actividad homoglutación sintetasa. La presente invención incluye la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 1) que codifica esta proteína, así como la secuencia de aminoácidos de la misma (SEQ ID NO 2), el uso de dicha secuencia de nucleótidos en el desarrollo de construcciones génicas, la expresión de la misma en células huésped y el uso de esta enzima en el campo de la síntesis de homoglutación.

ES 2 209 572 B1

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptido con actividad homoglutación sintetasa.

5 Sector de la técnica

La presente invención trata sobre la síntesis enzimática de homoglutación (hGSH) y la expresión génica del péptido con esta capacidad hGSH sintetasa (hGSHS) mediante técnicas de ingeniería genética en células huésped. El campo de aplicación es bioquímica, síntesis enzimática de compuestos químicos e, incluso, el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a presiones del medio.

Estado de la técnica

El hGSH (γ -glutamil-cisteinil- β -alanina) es un tripéptido homólogo del glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH). El GSH es el principal tiol de baja masa molecular en la mayoría de animales, plantas y procariontes, con la excepción de las leguminosas (que pueden contener hGSH) y de algunas plantas gramíneas (que contienen hidroximetilglutatión). El GSH desempeña importantes funciones, tales como la destrucción de radicales libres, el transporte y almacenamiento de azufre, la eliminación de metales tóxicos, o la protección de los grupos -SH de las proteínas [Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª ed. pp.146-150 Oxford University Press].

La función antioxidante del GSH se debe a su participación en procesos enzimáticos de eliminación de peróxidos y a su reacción directa con radicales libres. En animales, el GSH está implicado en la eliminación del peróxido de hidrógeno (catalizada por la GSH peroxidasa), en el metabolismo del ascorbato y en el mantenimiento de la comunicación celular [Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª ed. Oxford University Press; 146-150]. En plantas, el GSH elimina peróxido de hidrógeno mediante el ciclo ascorbato-GSH [Dalton DA, Tussell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3811-3815]. También participa en la regulación de vías metabólicas; así, se ha observado que interviene en la síntesis de flavonoides protectores frente a la irradiación ultravioleta, vía chalcona sintetasa [Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M y Frohnmeyer H (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell* 12: 1935-1950]. Además, el GSH es el precursor de fitoquelatinas esenciales en la tolerancia de la planta a estrés por metales pesados, y está implicado en la detoxificación de xenobióticos, herbicidas y pesticidas a través del sistema enzimático de la GSH-transferasa [Bergmann L, Rennenberg H (1993). Glutathione metabolism in plants, en Eds. L.J. de Kok y cols. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants*. pp. 109-123, SPB Academic Publishing, 1993; Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª ed. pp. 146-150. Oxford University Press]. Recientemente, se ha visto su relación con el ciclo celular de plantas, donde induce la transición de fase G1 a fase S [Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA., Reichheld, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Montagu MV, Inzé D, May MJ, Sung ZR (2000). The root *Meristemless1/cadmium sensitive2* gene defines a GSH-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97-109].

Las funciones del hGSH parecen ser similares a las del GSH. Así, el hGSH es también antioxidante, pues neutraliza radicales libres altamente tóxicos [Kapheck S (1988) Homogluthathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol. Plant.* 74: 727-732; Zopes H, Klapheck S, Bergmann L (1993). The function of homogluthathione and hydroxymethylglutathione for the scavenging of hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 34: 515-521], es la principal forma de almacenamiento y transporte de azufre [Macnicol PK, Bergmann L (1984). A role for homogluthathione in organic sulfur transport to the developing mung bean seed. *J. Biol. Chem.* 254: 6499-6504], participa en la detoxificación de xenobióticos (Breux EJ, Patanella JE, Sanders EF (1987) Chloroacetanilide herbicide selectivity: analysis of glutathione and homogluthathione in tolerant, susceptible, and safened seedlings. *J. Agric. Food Chem* 35:187-204], y es un precursor de las fitoquelatinas que neutralizan los metales tóxicos [Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1986) Phytochelatin, the heavy metal binding peptides of the plant kingdom. En: Rennenberg H, Brunold C De Kok LJ, Stulen I (eds.), *Sulfur nutrition and sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. SPB Acad. Publ., The Hague, pp.89-95]. Además, por analogía con el GSH, es posible que juegue un papel en la regulación metabólica y del ciclo celular en aquellos tejidos que contienen hGSH en vez de GSH [Matamoros M, Moran JF, (turbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M (1999) Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121: 879-888]. De todo ello se deduce que el hGSH puede tener tanta importancia comercial como el GSH.

La síntesis tanto de GSH como de hGSH se realiza en dos pasos: el primero de ellos es común para los dos metabolitos y está catalizado por el enzima γ -glutamylcisteína sintetasa (EC 6.3.2.2) [Huang CS, Moore WR, Meister A (1988) On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis inhibition, and regulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 2464-2468]. El segundo paso está catalizado por una sintetasa específica para cada tripéptido: GSH sintetasa (GSHS; EC 6.3.2.3.) para el GSH [Law MY, Halliwell B (1986) Purification and properties of glutathione synthetase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Sci.* 43: 185-191], o hGSHS para el hGSH [Macnicol PK (1987) Homogluthathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity. *Plant Sci.* 53: 229-235]. La distribución relativa de ambas sintetatas en los distintos tejidos y especies de leguminosas determina los correspondientes niveles de GSH y hGSH que éstas contienen [Matamoros M, Moran JF,

Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121: 879-888].

5 En procariontes, tanto el GSH como sus enzimas biosintéticos están ampliamente distribuidos y en algunas bacterias se han encontrado elevadas concentraciones de GSH [Moran JF, Matamoros MA, Iturbe-Ormaetxe I, Becana M (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392].

10 En la actualidad la producción de hGSH a nivel comercial se realiza por síntesis química. El hGSH es sintetizado a partir de sus precursores γ -glutamylcisteína y β -alanina. Este proceso de síntesis química es caro [desde 0.65 dólares/mg; comunicación personal del Dr. Gautam Sarath, Jefe del Servicio de síntesis de péptidos. *Protein Core Facility*. University of Nebraska-Lincoln, EEUU], por lo que su producción enzimática con hGSHS es más específica y puede abaratar costes.

15 Hasta ahora nunca se ha purificado completamente ningún enzima con actividad hGSHS. Este enzima sólo está presente en ciertas leguminosas y su aislamiento a partir de tejido vegetal resulta de gran complejidad, probablemente debido a su elevada labilidad y baja abundancia en tejidos vegetales [Macnicol PK (1987) Homoglutathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity. *Plant Sci.* 53: 229-235], por lo que nunca se ha purificado totalmente esta proteína. Asimismo, existen pocos genes de hGSHS descritos. Dos de ellos han sido descubiertos por nuestro grupo a partir de plantas de guisante y de judía, otro a partir de soja descrito por un grupo norteamericano, y un cuarto gen es una secuencia parcial obtenido a partir de la planta *Medicago truncatula* [Moran JF, Matamoros MA, Iturbe-Ormaetxe I, Becana M (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* 124: 1381-1392]. Excepto el descrito en la presente invención, ninguno de estos genes ha sido sobre-expresado ni caracterizado para demostrar fehacientemente su actividad bioquímica, por lo que un enzima disponible con esta actividad resultaría de gran interés.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

30 La presente invención describe la obtención de una nueva proteína con actividad hGSHS. Este enzima presenta gran utilidad en la síntesis de hGSH y es una proteína clave en determinados procesos celulares. La presente invención incluye la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 1) que codifica esta proteína, así como la secuencia de aminoácidos de la misma (SEQ ID NO 2), el uso de dicha secuencia de nucleótidos en el desarrollo de construcciones génicas, la expresión de la misma en células huésped, dichas células huésped (entre otras, la célula CECT 5948) y el uso de esta enzima en el campo de la síntesis de hGSH. Finalmente, se incluye el uso de estos distintos objetos de la presente invención, secuencia de nucleótidos, vectores y células en el desarrollo y producción de plantas transgénicas resistentes a presiones del entorno.

Descripción detallada de la invención

40 Con el objeto de determinar la actividad enzimática hGSHS el gen que la codifica fue aislado a partir de RNA de guisante por transcripción reversa, seguido de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) usando oligonucleótidos específicos basados en la secuencia conocida de *gshs-2* de guisante [Moran JF, Matamoros MA, Iturbe-Ormaetxe I, Becana M (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392] (ver Ejemplo 1). La enzima codificada por esta secuencia nucleotídica (SEQ ID NO 1), que fue imposible clonar en posición sentido en los vectores pCRII (Invitrogen) o pET28a+ (Novagen) (datos no mostrados), fue expresada finalmente utilizando un sistema de expresión en células de insecto, lo cual forma parte de la presente invención. Esta nueva secuencia descrita de hGSHS de guisante en la presente invención (SEQ ID NO 1) presenta unas diferencias de cambios en varias bases con respecto a la publicada anteriormente (nucleótido n°: 8, 217, 346, 354, 454, 496, 631, 727, 752, 779, 815, 852, 871, 1225, 1243, 1246, 1249, 1276, 1352, 1379, y ya fuera de la secuencia codificante 1642, 1644 y 1645; contabilizados a partir del primer nucleótido) y forma parte de la presente invención.

55 Así, en la presente invención el fragmento de DNA codificante de la hGSHS se ha subclonado en el vector pCRII y transferido al vector pFastbac HTb. Utilizando el sistema de expresión con baculovirus "BAC-TO-BAC" de Life Technologies se ha conseguido producir gran cantidad del enzima hGSHS (ver Ejemplo 2). Posteriormente, el DNA del báculo recombinante fue purificado y utilizado para transfectar células de insecto que sobre-expresan la proteína hGSHS.

60 Cualquier otro vector de expresión, conocido en el estado del arte de referencia del objeto de la presente invención, y que contenga la secuencia de nucleótidos descrita en la presente invención (SEQ ID NO 1) forma parte de la presente invención. De igual forma el uso de células huésped transformadas, distintas de las utilizadas en la presente invención, que están en el estado del arte y que permitan la expresión y obtención del polipéptido de la presente invención (SEQ ID NO 2) forman parte de la presente invención.

Finalmente, el sistema de expresión con baculovirus desarrollado en este trabajo ha permitido producir importantes cantidades de hGSHS altamente pura. La producción de hGSHS por células de insecto infectadas por ba-

ES 2 209 572 B1

culovirus recombinantes se optimizó en las etapas iniciales. Variando el tiempo de infección se observó que este enzima se produce en elevadas cantidades después de 24 horas del inicio de la infección y que esta elevada producción se mantiene durante 3 días más, hasta que los productos de degradación se hacen más aparentes, tal y como se aprecia en las hibridaciones “western” de geles de poliacrilamida con SDS. La masa molecular aparente de la proteína expresada (59 kDa) se correspondió con la predicha a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 1). Este nuevo polipéptido (SEQ ID NO 2), que como se describe posteriormente presenta actividad hGSHS forma parte de la presente invención. Este polipéptido (SEQ ID NO 2) presenta una serie de cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a la descrita anteriormente (aminoácido n°: 2, 117, 271, 283, 407, 450 y 459).

Por otro lado, estos vectores de expresión génica pueden contener elementos, entre otros, que permitan una eficaz regulación de dicha expresión génica, que permitan y faciliten su posterior purificación (ejemplo de la presente invención, una cola de polihistidinas) o que permita la separación de esta cadena de histidina de la secuencia de aminoácidos en que reside la actividad enzimática (ejemplo de la presente invención, punto de corte de la proteasa rTEV) y forman parte de la presente invención.

Como parte de la presente invención se llevó a cabo la producción a gran escala que permitió producir gran cantidad de proteína. La proteína es producida por el sistema con una cola de polihistidina (6xHis) (SEQ ID NO 3), lo que ha permitido su purificación en un solo paso usando una columna con resina de afinidad cargada con iones cobalto. La proteína eluyó de la columna de cobalto con 150 mM de imidazol y mostró una gran pureza (>95%) en geles de SDS teñidos con azul de Coomassie o en hibridaciones “western” de estos geles mediante inmunodetección frente a la cola de polihistidina. La proteína purificada se utilizó a continuación en los análisis cinéticos sin eliminar la cola de polihistidina.

Por último, en la presente invención se procedió, por primera vez, a la caracterización cinética del enzima recombinante de la presente invención. El enzima recombinante obtenido en la presente invención (SEQ ID NO 2) conservó su actividad catalítica, lo que ha permitido determinar sus constantes cinéticas de afinidad para la β -alanina y la glicina. Los datos en conjunto descritos en la Tabla I confirman que la proteína descrita en la presente invención y sobre-expresada, es una hGSHS totalmente funcional en la síntesis de hGSH y forma parte de la presente invención, así como el hGSH obtenido por este procedimiento enzimático.

TABLA I

	K_m	V_{max}	Constante de especificidad (V_{max}/K_m)
	(mM)	(nmol/min mg proteína)	
β -alanina	1.9 ± 0.3	4719 ± 430	2350 ± 331
Glicina	104 ± 9	4199 ± 108	41 ± 4

Además, pudo determinarse la actividad enzimática de fragmentos de esta secuencia polipeptídica e identificar aquéllas, que siendo más pequeñas que la SEQ ID NO 2, mantienen una actividad hGSHS similar a ésta, por lo que representarían un ahorro en la expresión de un péptido con dicha actividad. Estos fragmentos de la SEQ ID NO 2 con actividad hGSHS, así como los fragmentos de la SEQ ID NO 1 que los codifican forman parte de la presente invención.

Por otro lado, con el conocimiento de la actividad enzimática de esta secuencia SEQ ID NO 2 y de sus fragmentos, y por ende de su secuencia de nucleótidos codificante, y por el estado del arte del objeto de la presente invención, pueden identificarse secuencias de nucleótidos con homología con dicha secuencia SEQ ID NO 1 en otros seres vivos: plantas, microorganismos y animales con actividad homoglutation sintetasa. Estas secuencias de nucleótidos pueden presentar una homología de, al menos, un 70%, preferentemente de, al menos un 85%, ó más preferentemente de, al menos, un 95% forman parte de la presente invención.

Finalmente, otro objeto de la presente invención es el uso de las células transformadas que contienen la SEQ ID NO 1 y capaces de expresar un polipéptido con actividad hGSH sintetasa en la producción de plantas transgénicas que precisen adquirir nuevas características, entre otras, como la tolerancia al estrés por metales pesados y la capacidad de detoxificación de herbicidas y pesticidas a [Bergmann L, Rennenberg H (1993). Glutathione metabolism in plants, en Eds. L.J. de Kok y cols. Sulfur Nutrition and assimilation in Higher Plants. pp. 109-123, SPB Academic Publishing, 1993; Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, 3a ed. pp. 146-150. Oxford University Press] y forma parte de la presente invención.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1.- Gel de SDS teñido con azul de Coomassie en (A) y su hibridación western con anticuerpo frente a la cola de polihistidina en (B). Las calles corresponden a: (1) marcadores de peso molecular kDa; (2) extracto antes de pasar por la columna; (3) fracción primera de 150 mM de imidazol de la purificación con columna afinidad de cobalto; y (4) fracción segunda de 150 mM de imidazol.

Ejemplos de la invención

10 Ejemplo 1

Aislamiento y clonado del cDNA que codifica hGSHS en guisante

15 Los guisantes nodulados (*Pisum sativum* L cultivar Lincoln x *Rhizobium leguminosarum* NLV8) crecieron en condiciones medioambientales controladas según se describe en [Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty JF, Moran JF, Becana M (1997) N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plana Physiology* 113: 1193-1201]. Las plantas estaban en periodo de crecimiento vegetativo cuando se cosecharon los nódulos utilizados para aislar el gen hgshs. La cosecha se realizó con guantes y los nódulos se congelaron inmediatamente a -80°C.

20 Posteriormente, se extrajo el RNA total de los nódulos de guisante utilizando fenol caliente seguido de precipitación con LiCl [de Vries SC, Springer J, Wessels JHG (1982) Diversity of abundant messenger-RNA sequences and patterns of protein synthesis in etiolated and greened pea seedlings. *Planta* 156: 129-135]. Las trazas de DNA contaminante fueron eliminadas incubando el RNA total (5 µg) con 2 unidades de DNasa 1 a 37°C durante 10 min. La DNasa fue a continuación inactivada con EDTA 2.5 mM a 65°C durante 15 min. La transcripción reversa fue realizada utilizando transcriptasa reversa (Superscript, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y el oligonucleótido 5'-CTCGAGGATCCGCGGCCGC-(T)₂₀-3'. El cDNA obtenido se utilizó como molde en una PCR con oligonucleótidos específicos diseñados basándose en la secuencia conocida del gen gshs-2 de guisante [Moran JF, Matamoros MA, Iturbe-Ormaetxe I, Becana M (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules: Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392; número de acceso en GenBank AF258319]. Estos oligonucleótidos fueron: sentido 5'-CACCATGGCTAAATCATCTCAACAGC-3', antisentido 5'-CTAATCGCA GCGGCCGCAATGCTA-3' y contenían, además, una corta secuencia (subrayada) con los sitios de restricción para *NcoI* y *NotI*, respectivamente. Los componentes de la PCR fueron cDNA molde 8 µL, 0.3 µM de cada oligonucleótido, 0.2 mM dNTPs (Life Technologies), 1.5 mM MgCl₂ (Life Technologies), y 3.5 unidades de Expand High Fidelity DNA polimerasa (Roche Biochemicals) en un volumen final de 100 µL. El programa del termociclador consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos (94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, 72°C durante 2 min), y un paso final de elongación a 72°C durante 10 min. El producto de la reacción fue cargado en un gel de agarosa y separado por electroforesis horizontal y se corresponde con la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 1) y forma parte de la presente invención.

40 *Clonado y construcciones.* La banda del tamaño esperado (1.7 kb) fue extraída del gel, utilizando el kit "QIAquick gel extraction" (QIAGEN, Santa Clarita, California, EEUU) y fue subclonado en el vector pCRII TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Se confirmó la identidad del clon obtenido secuenciando en las dos direcciones con oligonucleótidos de M13, usando AmpliTaq DNA polimerasa y el kit FS dye-terminator en un secuenciador automático ABI Prism MODEL 3700 (Perkin Elmer). El procesamiento de las secuencias obtenidas fue llevado a cabo con programas del Genetics Computer Group (Madison, Wisconsin, EEUU) (SEQ ID NO 1).

50 Para la construcción del plásmido donador (pFastbac), el gen *hgshs* fue separado del vector pCRII por digestión con los enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* y se realizó una electroforesis horizontal (Bio-Rad) para la separación de los fragmentos y el inserto obtenido fue ligado en el vector pFastbac HTb (Life Technologies) entre los sitios *NcoI* y *NotI*. Hay que indicar que este vector ha permitido la inclusión en el polipéptido resultante de su posterior expresión de una región espaciadora posterior- His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr- a una cola de polihistidina y de una secuencia que codifica para el lugar de reconocimiento de la proteasa rTEV - Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly- (recombinant TEV protease, Life Technologies) (SEQ ID NO 3). La pequeña región de aminoácidos entre la etiqueta de polihistidinas y el sitio de reconocimiento denominada "región espaciadora" es importante si se quiere realizar el corte cuando la proteína está pegada a la resina de afinidad.

60 Esta construcción se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5α, y las colonias positivas se identificaron mediante PCR de una sola colonia, usando oligonucleótidos específicos de pFastbac (Life Technologies) y siguiendo el procedimiento de PCR descrito anteriormente. Se extrajo DNA del plásmido y se secuenció para confirmar la inserción dentro del marco de lectura correcto.

Ejemplo 2

65 *Transfección de las células de insecto y producción de virus*

Se aisló el DNA de pFastbac::*hgshs* a partir de un cultivo de células DH5 α, durante 16 horas a 37°C (estas células DH5 α transformadas con el vector pFastbac::*hgshs* han sido registradas en la Colección Española de Cultivos Tipo

con código de referencia CECT 5948). Se utilizó una alícuota de este plásmido (1/20 del total del plásmido obtenido) para transformar células competentes *E. coli* DH10Bac siguiendo instrucciones del sistema de expresión “BAC-TO-BAC” (Life Technologies). Las colonias positivas se distinguieron como colonias blancas en placas de agar-LB que contenían IPTG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-Gal (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los antibióticos kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se reconfirmaron por PCR de una sola colonia.

Las colonias positivas, que contenían el bÁcrido, fueron crecidas durante 16 h, a 37°C en medio LB líquido. El DNA de alto peso molecular del bÁcrido fue aislado y utilizado para transfectar la línea celular Sf21 de *Spodoptera frugiperda* utilizando el reactivo Cellfectin (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La células de insecto se crecieron en monocapa a 27°C durante 72 h en medio TC100 (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino y los antibióticos neomicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina G (62.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en frascos de cultivo de 25 cm² (5 mL de medio de cultivo). Los virus recombinantes fueron recolectados por centrifugación a baja velocidad 48 h después de la transfección del DNA del bÁcrido en las células de insecto.

15 Ejemplo 3

Purificación y caracterización de la hGSHS recombinante

Para optimizar la sobre-expresión de hGSHS, se estudió el efecto de la cantidad del virus inoculado y del periodo de incubación de las células con el virus. Se infectaron células de insecto confluentes en frascos de cultivo de 25 cm² (5 mL de medio de cultivo), con diferentes cantidades de virus recombinantes, y se recolectaron por centrifugación después de 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Las células fueron resuspendidas en solución de cargada de gel de SDS (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, y 10% glicerol). Después de hervir las muestras durante 5 min, las proteínas se separaron por electroforesis en gel de SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Para el análisis western la membrana se bloqueó con tampón 5x PBS pH 7.4, 0.1% Tween-20 y 5% leche desnatada durante 16 h, tras lo cual se lavó 3 veces durante 10 min con tampón 1x Tween-TBS 7.5. Como anticuerpo primario se utilizó anticuerpo monoclonal anti-6xHis (Clontech, Palo Alto CA) a una dilución 1:3000 durante 1 h, después de lo cual se lavó la membrana 3 veces de igual modo. Como anticuerpo secundario se usó anti-ratón conjugado con la fosfatasa alcalina, y a continuación se realizaron 3 lavados como se describe anteriormente. La detección colorimétrica se realizó con el sistema de sustrato líquido BCIP/NBT (Sigma). Este sistema permitió una cantidad cercana a los 0.5 mg de proteína por cada “batch” de 5 mL de medio de cultivo.

Para producir la proteína a gran escala los cultivos de células de insecto se realizaron en frascos de cultivo grandes (225 cm², 50 mL de medio de cultivo). Las células se infectaron con virus recombinantes, se recolectaron 48 h más tarde y se rompieron por choque osmótico después de una incubación de 45 min en hielo, seguida de centrifugación (12,000 g, 20 min). El medio de lisis consistió en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM fosfato de sodio pH7.5, 10 mM Na pirofosfato, 1% Triton X-100 y los inhibidores de proteasas: 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzensulfonilfluoruro y cóctel de inhibidores de proteasas de Boehringer (#1873580).

Los extractos libres de células se cargaron en una columna de afinidad con cobalto “Talon” (Clontech) siguiendo el método “batch/flow purification” como describe el fabricante. La proteína se eluyó de la columna con tampón imidazol (50 mM de fosfato de sodio pH 7.0, 300 mM NaCl, y 150 mM de imidazol). Se recogieron 5 fracciones de 0.5 mL de la columna y se analizaron por electroforesis en gel de SDS-PAGE seguido de hibridación western, como se ha descrito anteriormente, para confirmar la presencia y la pureza de la proteína hGSHS (Figura 1B). El proceso de purificación fue también seguido por tinción de geles con azul de Coomassie (Figura 1A). La presencia de un sitio de corte para la proteasa rTEV (Life Technologies) en el polipéptido producido permitiría la posterior eliminación de esta etiqueta de histidinas y de la región espaciadora (ver “Lista de secuencias”). Este paso no resultó necesario para la presente invención.

Caracterización enzimática. Los ensayos de actividad GSHS y hGSHS se basaron en la síntesis de GSH y hGSH con glicina y β -alanina como sustratos, respectivamente [Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M (1999). Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121: 879-888]. Los tioles producidos se derivatizaron con monobromobimano y se cuantificaron por HPLC con detector de fluorescencia [Fahey RC, Newton GL (1987) Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymology* 143: 85-96] con modificaciones menores [Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M (1999). Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol* 121: 879-888].

Las propiedades catalíticas (K_m aparente, V_{max}) de la hGSHS se midieron en condiciones de concentración saturante de γ -glutamylcisteína (0.5 mM) y un rango de concentraciones de glicina (10-200 mM) o β -alanina (0.4-5 mM). El enzima mostró cinéticas saturantes (representaciones de Lineawer-Burk lineales) respecto de los dos sustratos. La cuantificación de proteína se llevó a cabo usando un microensayo (Bio-Rad) y seroalbúmina bovina como estándar. En la Tabla I se muestran las constantes obtenidas para estos dos sustratos. Se puede observar que la afinidad para la β -alanina es muy elevada ($K_m=1,9$ mM) comparada con la afinidad mostrada para la glicina ($K_m=104$ mM). Aunque la velocidad máxima (en condiciones saturantes de sustrato) no es muy diferente para ambos sustratos, la constante de especificidad (V_{max}/K_m) es 57 veces mayor para la síntesis de hGSH que para la de GSH.

ES 2 209 572 B1

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido **caracterizado** porque posee actividad homoglutation sintetasa (hGSHS) y por la SEQ ID NO 2.
- 5 2. Secuencia de nucleótidos **caracterizada** porque codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2 **caracterizada** por la SEQ ID NO1.
- 10 4. Secuencia de nucleótidos **caracterizada** porque presenta una homología con la secuencia según la reivindicación 3 de, al menos, un 70%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.
5. Vector de expresión génica **caracterizado** porque contiene una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a la 4 y las secuencias necesarias para una correcta expresión en una célula huésped.
- 15 6. Vector de expresión según la reivindicación 5 **caracterizado** porque pertenecen, entre otros, al siguiente grupo: plásmido, virus y báculo.
7. Célula transformada **caracterizada** porque contiene un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.
- 20 8. Célula transformada según la reivindicación 7 **caracterizada** porque es la célula CECT 5948.
9. Célula transformada según la reivindicación 7 **caracterizada** porque es una célula de insecto, preferentemente, entre otras, Sf21 de *Spodoptera frugiperda*.
- 25 10. Virus recombinante **caracterizado** porque contiene una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a la 4 y porque se obtiene a partir de una célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 9.
- 30 11. Célula de insecto **caracterizada** porque son inoculadas por un virus recombinante según la reivindicación 10.
12. Polipéptido según la reivindicación 1 **caracterizado** porque se obtiene a partir de célula según la reivindicación 11.
- 35 13. Uso de los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 12 en la síntesis enzimática del tripéptido homoglutation.
14. Uso de la secuencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 en el desarrollo y producción de plantas transgénicas.
- 40 15. Uso de los vectores según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 en el desarrollo y producción de plantas transgénicas.
- 45 16. Uso de la célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 en el desarrollo y producción de plantas transgénicas.

50

55

60

65

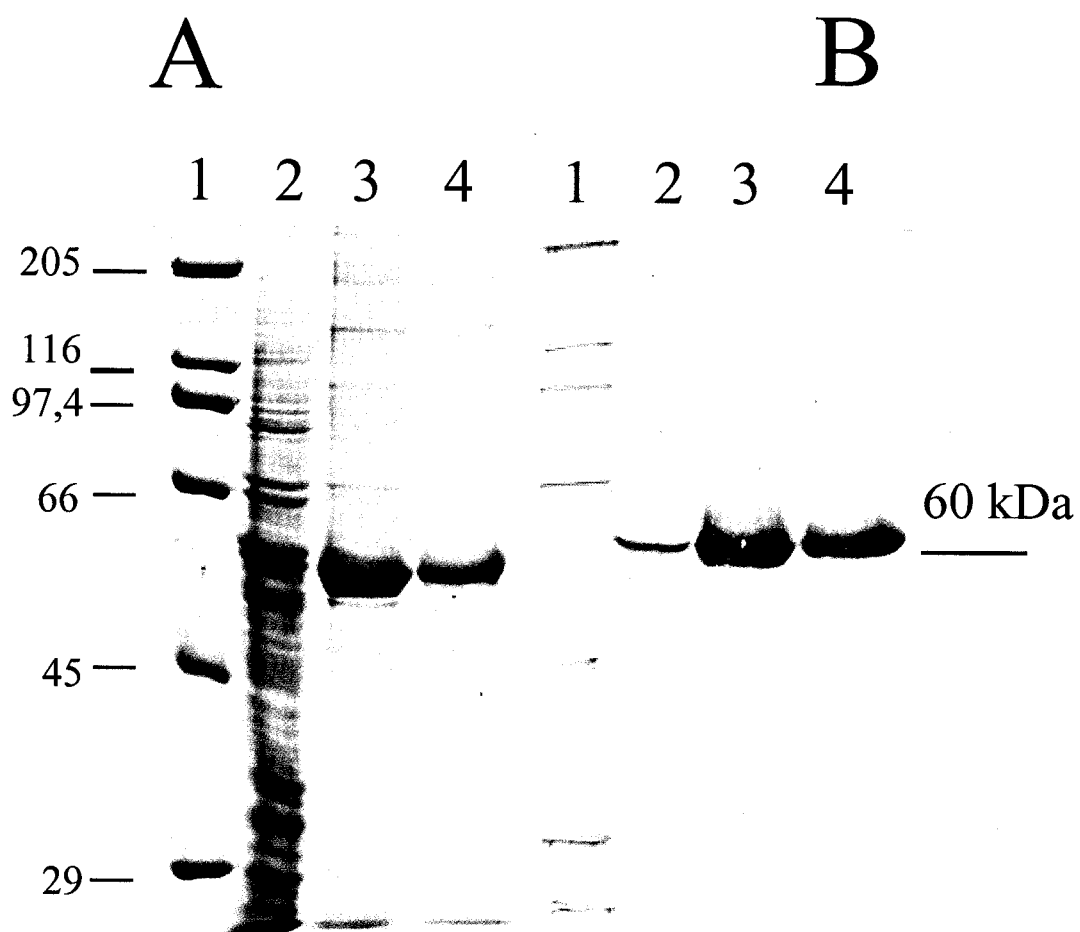


Figura 1

ES 2 209 572 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> POLIPÉPTIDO CON ACTIVIDAD HOMOGLUTATION SINTETASA (HGSHS)

<130> Polipéptido con actividad hGSHS

10 <140>

<141>

<160> 3

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1656

<212> ADN

<213> *Pisum sativum* L cultivar Lincoln

25 <220>

<221> CDS

<222> (5)..(1486)

30 <400> 1

cacc atg gct aaa tca tct caa cag ctg aac gta gag gta gaa gaa gtg 49
Met Ala Lys Ser Ser Gln Gln Leu Asn Val Glu Val Glu Glu Val
35 1 5 10 15

40 gtg gat gat tct tct ccc agc ttg aat aac tac cat gag att gat gaa 97
Val Asp Asp Ser Ser Pro Ser Leu Asn Asn Tyr His Glu Ile Asp Glu
20 25 30

45 aaa gtt gtc caa caa atc gtt tac gat gct ctt gtc ttt acc act ctc 145
Lys Val Val Gln Gln Ile Val Tyr Asp Ala Leu Val Phe Thr Thr Leu
35 40 45

50 aat ggt ctc ctt gtc ggt gat aaa tct gtt cag aga tca gga aga gta 193
Asn Gly Leu Leu Val Gly Asp Lys Ser Val Gln Arg Ser Gly Arg Val
55 50 55 60

60

65

ES 2 209 572 B1

	Pro	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Tyr	Gly	Asp	Asp	Leu	Arg	
	385					390						395					
5	gag act ctt cta aaa tta cag aac tca gat tct caa gaa gac gca gcc 1249																
	Glu	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	Gln	Asn	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala	Ala	
10	400					405				410						415	
	tac att ctt atg cag agg ata ttt cca gtt aac aca gag gca att ttg 1297																
15	Tyr	Ile	Leu	Met	Gln	Arg	Ile	Phe	Pro	Val	Asn	Thr	Glu	Ala	Ile	Leu	
					420					425					430		
	gtg cgt aac ggt ttc ttg cat aag gat cgc gtc att tca gaa ttt gga 1345																
20	Val	Arg	Asn	Gly	Phe	Leu	His	Lys	Asp	Arg	Val	Ile	Ser	Glu	Phe	Gly	
				435					440					445			
25	ata ttc ggt aca tat tta agg aac aag gat aag att atc gtg aat aat 1393																
	Ile	Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Arg	Asn	Lys	Asp	Lys	Ile	Ile	Val	Asn	Asn	
30			450					455						460			
	gaa agt ggc tat atg gtt cgt aca aaa cca tca tta tct gat gaa ggt 1441																
35	Glu	Ser	Gly	Tyr	Met	Val	Arg	Thr	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Glu	Gly	
	465							470						475			
	ggg gtt tta cct ggt ttt gga gta ata gat agt gta tac ctc act 1486																
40	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ile	Asp	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr		
	480					485				490							
45	tgatgaagcc aactcaatgc tgaattatga gggactgca aaacattatg ttgttgattg 1546																
	atggcttgca tgttaaaaat ctgtttcttg tactccaaga aacaacaagt cccttcattg 1606																
50	gatgtagaga ctttaagttc taatcttagc attgcggccg ctgcgattag 1656																
55	<210> 2																
	<211> 494																
	<212> PRT																
	<213> <i>Pisum sativum</i>																
60	<400> 2																
	Met Ala Lys Ser Ser Gln Gln Leu Asn Val Glu Val Glu Glu Val Val																
65	1					5				10						15	

ES 2 209 572 B1

Asp Asp Ser Ser Pro Ser Leu Asn Asn Tyr His Glu Ile Asp Glu Lys
 20 25 30
 5
 Val Val Gln Gln Ile Val Tyr Asp Ala Leu Val Phe Thr Thr Leu Asn
 35 40 45
 10
 Gly Leu Leu Val Gly Asp Lys Ser Val Gln Arg Ser Gly Arg Val Pro
 50 55 60
 15
 Gly Val Gly Leu Val His Leu Pro Phe Ser Leu Leu Pro Pro Pro Phe
 65 70 75 80
 20
 Pro Gln Thr His Trp Asn Gln Ala Cys Glu Leu Ala Pro Leu Phe Asn
 85 90 95
 25
 Glu Leu Val Asp Arg Val Ser Leu Asp Ala Asn Phe Leu Gln Gln Ser
 100 105 110
 30
 Leu Ser Arg Thr Thr Lys Val Asp Glu Phe Thr Ser Arg Leu Leu Asp
 115 120 125
 35
 Ile His Ser Lys Met Leu Glu Ile Asn Lys Lys Glu Glu Ile Arg Leu
 130 135 140
 40
 Gly Leu Phe Arg Ser Asp Tyr Met Phe Asp Glu Lys Thr Gln Ser Leu
 145 150 155 160
 45
 Leu Gln Ile Glu Met Asn Thr Ile Ser Thr Ser Phe Ser Gly Val Gly
 165 170 175
 50
 Cys Ile Ile Thr Gln Leu His Arg Asn Ile Leu Ser Arg Tyr Gly Lys
 180 185 190
 55
 Ser Leu Gly Leu Asp Ser Glu Arg Val Pro Thr Asn Thr Ala Asp Ser
 195 200 205
 60
 Lys Tyr Ala Glu Ala Leu Ala Lys Ala Trp Ser Glu Tyr Asn Asn Pro
 210 215 220
 65

ES 2 209 572 B1

5 Phe Gly Thr Tyr Leu Arg Asn Lys Asp Lys Ile Ile Val Asn Asn Glu
450 455 460

10 Ser Gly Tyr Met Val Arg Thr Lys Pro Ser Leu Ser Asp Glu Gly Gly
465 470 475 480

15 Val Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile Asp Ser Val Tyr Leu Thr
485 490

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:cola de histidina, zona espaciadora y zona de corte rTEV

<400> 3

30 Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr
1 5 10 15

35 Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala
20 25

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 209 572

② Nº de solicitud: 200101494

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07K 14/415, C12N 9/10, 15/29, 5/14, 5/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MORAN, J.F. et al. "Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization". PLANT PHYSIOLOGY. Noviembre 2000, Vol. 124, páginas 1381-1392, todo el documento.	4
X	BASE DE DATOS EMBL, Hinxton, UK, 13.05.1999, FRENO, P. et al. ^A Medicago truncatula homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication". Nº de acceso AF075700, resumen.	4
A	MATAMOROS, M.A. et al. "Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules". PLANT PHYSIOLOGY. Noviembre 1999, Vol. 121, páginas 879-888, todo el documento.	1-16

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

28.04.2004

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1