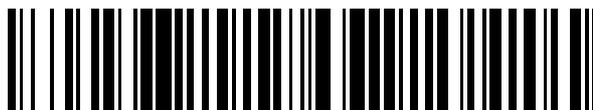


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 928**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2001 E 01938813 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1290200**

54 Título: **Translocación de proteínas en células de plantas**

30 Prioridad:

**19.05.2000 NL 1015252**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.11.2013**

73 Titular/es:

**STICHTING VOOR DE TECHNISCHE  
WETENSCHAPPEN (33.3%)**

**Van Vollenhovenlaan 661**

**3527 JP Utrecht, NL;**

**UNIVERSITEIT LEIDEN (33.3%) y**

**STICHTING BINAIR VECTOR SYSTEEM (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HOOYKAAS, PAUL JAN JACOB;**

**VERGUNST, ANNETTE CAROLINE y**

**SCHRAMMEIJER, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

**ES 2 427 928 T3**

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).

## DESCRIPCIÓN

Translocación de proteínas en células de plantas

5 La presente invención se refiere a un método para llevar a cabo una modificación en una célula no humana, en el que un sistema de transferencia se pone en contacto con la célula a ser modificada, dicho sistema de transferencia comprende una membrana con un sistema de transporte de proteínas en ella que comprende un poro que comprende un complejo VirB y la proteína VirD4, en el que el sistema de transferencia comprende una proteína de fusión o es capaz de crear una proteína de fusión que se introduce en la célula por medio del sistema de transporte de proteínas.

Dicho método se sugirió por Zhou, XR y otros (Journal of Bacteriology, 181 (14), p. 4342-4352 (1999)). Esta publicación da a conocer que la proteína VirE2, una proteína de unión a ADN de hebra única de *Agrobacterium tumefaciens*, se puede transferir a una célula huésped por un *Agrobacterium* tumorigénico. Zhou y otros dan a conocer que eran sólo fueron capaces de introducir una secuencia de aminoácidos heteróloga en el aminoácido 39 (a partir del N-terminal, como es habitual en la técnica) que fue transferida a la célula huésped. Se llegó a la conclusión de que no es viable en la práctica basar un sistema de administración de proteínas en fusiones en uno de los dos extremos de VirE2. Como mínimo, las proteínas pequeñas son toleradas como una inserción en el aminoácido 39.

El objeto de la presente invención es dar a conocer un método, que es simple de realizar y, si se desea, se lleva a cabo sin actividad nativa de VirE2 en la célula a ser modificada.

En consecuencia, el método según la presente invención, es el método que se describe en la reivindicación 1.

Sorprendentemente, se ha descubierto que, siempre que se cumplan las condiciones mencionadas anteriormente, una proteína puede ser introducida desde el exterior en una célula a ser modificada, cuya proteína se forma mediante el acoplamiento del polipéptido (segunda parte B) a un aminoácido N-terminal (interno) de VirF, VirD2, VirE2, VirE3 o MobA (primera parte A), como resultado de lo cual la actividad de la segunda parte de B introducida se puede expresar en la célula a ser modificada, como resultado de lo cual se modifica la célula. Esta modificación puede ser temporal (reversible) o permanente (irreversible). Las secuencias de aminoácidos de VirF, VirD2, VirE2, VirE3 y MobA están representadas por las respectivas secuencias número 1-5. Una cepa que comprende un plásmido (LBA8250, una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, que contiene el plásmido pTi15955. PTi15955 se describe por Sciaky y otros, Plasmid 1, p. 238-253 (1978)) que codifica todas las proteínas Vir, está en la colección Phabagen del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Países Bajos con el número de acceso PC2692. La proteína MobA es conocida a partir del plásmido IncQ RSF1010, que está presente en la cepa de *E. coli* K12 C600 con el número de acceso PC-V3110 de la colección NCCB del CBS, y se describió por Scholz, P. y otros en Gene 75, p. 271-288 (1989).

En la presente invención, un aminoácido correspondiente es un aminoácido según la tabla siguiente:

A, G;

S, T;

45 D, E;

N, Q;

50 R, K;

I, L, M, V; y

F, Y, W.

55 No es necesario mencionar que la primera parte A puede comprender más aminoácidos adyacentes o no adyacentes, idénticos o correspondientes a las secuencias definidas anteriormente.

La primera parte A, si se desea, comprende más aminoácidos desde el aminoácido 41 (a partir del C-terminal) de VirF, o VirE2 de VirE3 o VirD2 o MobA. Esto bajo la condición mencionada para VirE2.

En la presente invención, un vector se refiere a cualquier secuencia de ADN o ARN que, directa o indirectamente, conduce a la formación de la proteína de fusión en el sistema de transferencia.

65 El sistema de transferencia puede ser una célula, tal como de forma muy adecuada una célula bacteriana, tal como, en particular, *Agrobacterium tumefaciens*, pero también puede ser un sistema artificial, tales como una minicélula o

un sistema artificial de vesículas.

5 La proteína de fusión a ser transferida o bien se puede formar en el propio sistema de transferencia, por ejemplo, mediante la expresión de un vector que contiene un sistema de genes funcionales que se puede expresar produciendo la proteína de fusión, o la propia proteína de fusión se puede introducir en el sistema de transporte. Generalmente, este último será el caso en los sistemas de transporte artificiales. Una ventaja importante de dicho sistema de transporte artificial es que se puede introducir en el medio ambiente, por ejemplo, para el tratamiento de un cultivo, sin riesgo de propagación del material genético.

10 Preferentemente, la proteína de fusión se introduce en la célula sin la introducción de una secuencia de ADN o ARN. En el caso de la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* como sistema de transferencia, esto implica la ausencia de ADN-T. Esto significa que es posible modificar una célula sin introducir material genético en la célula a ser modificada.

15 Según una realización importante, la proteína de fusión introducida tiene actividad recombinasa.

20 En dicho caso, es de hecho posible llevar a cabo un cambio en el ADN cromosómico de la célula a ser modificada, sin la introducción de material genético adicional (un vector que codifica el ADN-T o péptido B) en la célula. Una aplicación importante, por ejemplo, es la eliminación de un gen marcador, cuya admisión en el medio ambiente no es deseable. En particular, esto puede incluir la eliminación de los genes de resistencia a antibióticos presentes entre secuencias de ADN en repetición directa a ser reconocidos por la recombinasa.

Convenientemente, una bacteria de la clase *Rhizobiaceae* se puede utilizar como sistema de transferencia.

25 Dichas bacterias, entre las que se encuentran *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Phyllobacterium*, son muy adecuadas para la modificación de plantas, levaduras u hongos. Otras bacterias que pertenecen a esta familia, tales como *Brucella*, son conocidas por su interacción con células animales y se pueden utilizar para la modificación de las mismas.

30 Según una realización preferente, se utiliza *Agrobacterium*, que se conoce que es muy adecuado para la modificación tanto de procariontes (bacterias) como de eucariontes (plantas, levaduras, hongos y células de animales).

35 Según una realización preferente, una célula seleccionada del grupo que comprende i) una célula de plantas; ii) una célula de levaduras, y iii) una célula de hongos, se utiliza como la célula a ser modificada.

La presente invención también se refiere a un vector, estando dicho vector caracterizado porque codifica un sistema de transporte de proteínas que comprende un poro que contiene un complejo VirB y proteína VirD4, así como una proteína de fusión BA tal como se define en la reivindicación 7.

40 Dicho vector se puede introducir en un sistema de transferencia, tal como una bacteria. Entonces, el vector posee toda la información que necesita ser expresada para la transferencia de la proteína de fusión, por lo que es posible que la proteína de fusión sea transferida a la célula a ser modificada.

45 Por último, la presente invención se refiere a un conjunto de vectores, caracterizado porque el conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican un sistema de transporte de proteínas que comprende un poro que contiene un complejo VirB y proteína VirD4, así como un vector adicional que codifica un péptido de fusión BA, tal como se define en la reivindicación 7.

50 La ventaja de dicho conjunto de vectores es que el vector o vectores que codifican el sistema de transporte de proteínas, se pueden introducir en un sistema de transferencia por separado a partir del vector adicional que codifica la proteína de fusión. Esto hace que sea posible la utilización de un sistema de transferencia, en particular una bacteria, como vehículo estándar para la modificación de una célula, en el que el sistema de transporte está provisto de un vector adicional que se expresa en el sistema de transporte para llevar a cabo la modificación.

55 La presente invención se ilustrará con referencia a los siguientes ejemplos y al dibujo, en el que la única figura muestra de forma esquemática un sistema de ensayo para demostrar la actividad Cre en plantas.

### Cepas bacterianas

60 La cepa de *Agrobacterium* LBA1010 (Koekman y otros, Plasmid 7 (1982); 119-132; Centraal Bureau voor Schimmelcultures; Baarn, Países Bajos, número de acceso: PC2805) posee el plásmido Ti no modificado pTiB6 en un fondo cromosómico C58. LBA 1100 (Beijersbergen y otros. Science 256 (1992), 1324-1327; fácilmente obtenido mediante el cultivo de CBS 102794, Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos, depositado el 17 de mayo de 2000 en ausencia de gentamicina para el curado del plásmido pSDM 3155 y el cribado de la ausencia del plásmido pequeño (aprox. 5,5 kb) de plásmido) es un derivado no oncogénico de LBA1010. Para este efecto, tanto las regiones T izquierda y derecha en pTiB6, así como los genes *tra* y *occ* se sustituyen por un marcador de

65

resistencia a espectinomicina, lo que resulta en el plásmido pAL1100, en el que la región *Vir* se mantiene intacta. En la presente solicitud se utilizaron varios mutantes de *vir*, derivados de LBA1100, respectivamente LBA 1142-1150 (Beijersbergen y otros. Science 256 (1992), 1324-1327) (Tabla 1). LBA2561 contiene una delección precisa del gen *virF* en pAL1100 (Schrammeijer y otros, Mol. Plant Micr. Int. 5 (1998), 429-433). La transformación y el crecimiento de las cepas bacterianas se llevaron a cabo tal como se describe en la literatura (Vergunst y col. Nucl. Acids Res. 26 (1998) 2729-2734) o según técnicas generales conocidas por el experto en la materia (Sambrook y otros. Molecular Cloning. A lab manual (1989)).

### Construcciones de plásmidos

La región de codificación del gen *cre* se clonó de forma traduccional a los genes *virE2* y *virF* de pTi15955, bajo el control de las respectivas regiones promotoras *vir*. Se llevaron a cabo fusiones tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal. Las construcciones de plásmidos se detallan a continuación.

#### Plásmido de control *cre*

La región de codificación del gen de la recombinasa *cre*, presente en el plásmido pUC19cre (Mozo y Hooykaas, Mol. Gen.

Genet 236 (1992), 1-7), se clonó como un fragmento *SphII/EcoRI* en pUC21 (Vieira y Messing, Gene 100 (1991), 189-194) que resultó en pSDM3120. Con el fin de eliminar el codón de iniciación ATG, se llevó a cabo una amplificación por PCR en el extremo 5' del gen *cre* con los cebadores *cre1* (5'-ggcagatctgTCCAATTTACTG) y *cre2* (5'-GATAATCGCGAACATCTTCAGG) en pSDM3120. Después de la digestión del fragmento de PCR con *BglII* y *NruI* (subrayado) este fragmento se intercambió por el fragmento correspondiente en pSDM3120 (que resultó en *cre*ΔATG o pSDM3121). Un fragmento *SalI* de pRAL3248 (Melchers y otros, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 249-259) en el que se encuentran *virE1* y *virE2* (estando ausentes las últimas 30 pares de bases del extremo 3') incluyendo la región promotora *virE*, se clonó en el lado de restricción *XhoI* de pSDM3121 (pSDM3122). Después de la digestión completa de pSDM3122 con *BglII* y la digestión parcial con *BstYI*, seguido por el aislamiento del fragmento de vector que porta el promotor *virE*, la zona de codificación *virE1*, el codón de inicio ATG de *virE2*, así como *cre* (ΔATG), el gen *cre* se unió de forma traduccional a través del autocierre al codón de inicio ATG de *virE2* (pSDM3126). Como resultado, la expresión del gen *cre* es controlada por el promotor *virE*. Posteriormente, este constructo se transfirió como un fragmento *StuI/XbaI* al plásmido pRL662 digerido con *SmaI/XbaI*, dando como resultado pSDM3147, es decir, el plásmido de control *cre* utilizado en estos experimentos. El plásmido pRL662 no movilizable con una amplia gama de huéspedes se obtiene mediante la sustitución del gen de resistencia a kanamicina, así como la región *mob* de pBBR1 MCS2 (Kovach y otros, BioTechn. 16 (1994), 800-802) con un marcador de resistencia a gentamicina (J. Escudero, Solicitud de Patente Europea Núm. 00200726.8).

#### Fusión *cre::virE2*

Con el fin de crear fusiones traduccionales entre *cre* y *virE2*, se eliminó el codón de parada del gen *cre*, para lo que se introdujo una mutación en el codón de parada (cursiva) mediante amplificación por PCR en el ADN de pSDM3126 utilizando los cebadores *cre 6* (5'-acgcatcgactATCGCCATCTTCCAGCAGGCGC) y *cre 7* (5'-cCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGG). Después de la digestión con *Clal* y *SalI* (subrayado), se substituyó el fragmento *Clal-SalI* de pSDM3126 correspondiente (que resultó en *cre*ΔSTOP o pSDM3127). Un fragmento *XhoI/NotI* de pBluevirE2 (ΔATG) que contiene la zona de codificación *virE2*, sin el codón de iniciación ATG, se ligó posteriormente en el vector pSDM3127 digerido con *SalI* y *NotI* (pSDM3128). pBluevirE2 (ΔATG) fue el resultado de la clonación de la región *VirE1-virE2* (*XhoI-SmaI*) del plásmido pRAL3248 (Melchers y otros, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 249-259) en pBLUEscript (*XhoI/EcoRV*) (Alting-Mees y Short. Nucleic Acids Res. 17 (1989): 9494), tras lo que se eliminaron *virE1* y el codón de inicio ATG de *virE2* utilizando un enlazador de *XhoI-StuI* (5'-tcgaGATCTTTCTGGCAATGAGAAATCCAGG y 5'-CCTGGATTCTCATTGCCAGAAAGATC. La fusión *cre::virE2* se transfirió posteriormente a pRL662 (*SmaI/XbaI*) como un fragmento *StuI/XbaI* de pSDM3128, lo que resultó en pSDM3129 (fusión *cre::virE2*).

#### Fusión *virE2::cre*

Un fragmento *SalI* de pRAL3248 que comprende *virE1* y *virE2* (estando ausente las últimas 30 bases del extremo 3') se clonó en pIC19R (Marsh y otros, Gene 32 (1984):. 481-485) (pSDM3123). En las etapas de clonación posteriores *cre* se fusionó al extremo 3' de *virE2*, en el que al mismo tiempo se restauraron las últimas 30 bases del extremo 3' de *virE2*, ausentes en pSDM3123. Para este fin, se clonó un fragmento *BglII/NruI* de pSDM3122, que comprende las 200 bases del extremo 5' de *cre*, sin el codón de iniciación ATG, en pIC19R (pSDM 3151). Se sintetizó un enlazador de *SalI/BglII* enlazador, que consiste en las últimas 30 bases del extremo 3' de *virE2*, con el fin de eliminar el codón de parada de *virE2* (cursiva) (5'-TCGACCGCGTAGCCAAAGCGTCAACAGCTTTcga y 5'-gatctcgAAAGCTGTTGACGCTTTGGCTACGCGG) y para llevar a cabo la fusión traduccional con *cre*. Este enlazador se clonó en PSDM 3151 (pSDM3152). Sin embargo, después de análisis de la secuencia, el sitio *BglII* entre el extremo 3' de *virE2*ΔSTOP y el extremo 5' de *cre*ΔATG se demostró que se pierde debido a una sustitución de base única. Esta mutación no está presente en la región que codifica *virE2* o *cre*, y no tiene ningún efecto en el marco de lectura de la fusión. El fragmento *SalI* de pSDM3123 se introdujo en el sitio *SalI* de pSDM3152 (pSDM3157),

mediante la clonación de la secuencia completa de *virE2* en marco con el extremo 5' de *cre*. Un fragmento *Nrul* aproximadamente de 600 pares de bases de pSDM3157 (el extremo 3' de *virE2*ΔSTOP y el extremo 5' de *cre*ΔATG) se utilizó posteriormente para reemplazar el fragmento *Nrul* en pSDM3148 (pSDM3148 es el resultado de la clonación de un fragmento *Stul/XbaI* de pSDM3122 en *XbaI/SmaI* de pRL662) dando como resultado una fusión traduccional entre la región completa de *virE2* y *cre* (pSDM3166, es decir, la fusión *virE2::cre*) bajo el control del promotor *virE*, y la expresión conjunta de *VirE1*.

#### Fusión *virF::cre*

10 Un fragmento *SacI/EcoRV* de 600 pares de bases de pRAL7088 (Schrammeijer y otros. MPMI 11 (1998) 429-433) que contiene el lado que flanquea el extremo 5' de *virF* y el lugar de unión ribosómico fue clonado en pBluescriptSK (Alting-Mees y Short. Nucleic Acids Res. 17 (1989): 9494), lo que resulta en pSDM3183. La señal de localización nuclear (NLS) del virus simian 40 (SV40) se sintetizó con un EcoRV ROMO y un extremo cohesivo *SaI* 3' (5'-ATCATGGATAAAGCGGAATTAATTCCCGAGCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCGAATTGGGTACCGG y la hebra complementaria), y se clonó en pSDM3183, lo que resultó en pSDM3184. El gen *virF* sin ATG y codón de parada se clonó en dos etapas en marco después de NLS de SV40. El codón de inicio ATG se eliminó por clonación de un enlazador *BamHI/NsiI* (5'-GATCCGAAATTCGAGTTTGGCGTGATGCA) en los sitios *BamHI* y *NsiI* de pRAL7088 (pSDM3192). Posteriormente, se clonó un fragmento *BamHI/SacI* de 1,5 pares de kilobases de pSDM3192 en pIC19H (pSDM3193). Un fragmento *SaI/XhoI* de 500 pares de bases de pSDM3193, que comprende *virF*Δ498-609ΔATG se clonó en marco con NLS de SV40 en el sitio *XhoI* de pSDM3184, lo que resultó en pSDM3185. Posteriormente, el codón de parada de *virF* se eliminó utilizando dos cebadores (5'-ATCCCTAACTTGGTCTTCAAC y 5'-cttagatcTAGACCGCGTTGATCGAGG) en una reacción de PCR en pRAL7088. El fragmento de PCR se subclonó como un fragmento de 175 pb en el vector pGEM T (Promega). Un enlazador *Stul/BglII* (5'-cctcgagccgggata y 5'-gatctatccgggctcgagg) se clonó en pSDM3121 digerido con *Stul/BglII* para introducir un sitio *XhoI* (subrayado) y para llevar a cabo la clonación adicional en marco de *cre* con *virF* (pSDM3121-L). Posteriormente, el extremo 3' de *virF* se clonó en marco en los sitios *XhoI/BglII* de pSDM3121-L como un fragmento *XhoI/BglII* aproximadamente de 110 pares de bases desde el vector pGEM-T hasta el extremo 5' de *cre* (lo que resultó en pSDM3186). Un fragmento *XhoI/SaI* de 1,2 kb de pSDM3186 se ligó en el sitio *XhoI* de pSDM3185, lo que resultó en pSDM3187. La fusión *virF::cre* se introdujo a continuación en pUC28 (Benes y otros, Gene 130 (1993); 151-152) como un fragmento *SacI/PstI*, y posteriormente se ligó a partir de este plásmido como un fragmento *EcoRI* en el sitio *EcoRI* de pRL662, lo que resultó en pSDM3153, es decir, el plásmido de fusión *NLS::virF::cre*.

#### Fusiones *cre::virF*

35 Un fragmento de 0,66 kb de pSDM3184, que tiene el lado de flanqueo de 5' de *virF* y la secuencia NLS de SV40, se clonó eventualmente a través de una etapa de clonación de *SacI/SaI* en pIC19H, seguido de una clonación *HindIII/SaI* en pIC19R, como un fragmento *SaI/XhoI* en el sitio *XhoI* de pSDM3121. Esto dio lugar a una fusión en marco de la NLS de SV40 al extremo 5' de *cre* (pSDM3188). El codón de parada de *cre* en pSDM3188 se eliminó posteriormente mediante la sustitución del fragmento *Clal/SaI* (con el extremo 3' de *cre* incluyendo el codón de parada) con el fragmento *cre*ΔSTOP *Clal/SaI* de pSDM3127 (pSDM3179). Un fragmento *SaI/EagI* de 690 pb de pSDM3193 que comprende *virF*ΔATG se clonó en pSDM3179 digerido con *SaI/NotI*, lo que resultó en pSDM3189. Un fragmento *HindIII/XbaI* de pSDM3189 se clonó en los sitios *HindIII* y *XbaI* de pRL662, lo que resultó en pSDM3154 (el plásmido de fusión *NLS::cre::virF*).

45 Además, se realizaron varias deleciones de *virF* y se clonó en traduccionalmente al extremo 3' de *cre*. Utilizando los cebadores F126 (5'-acgcgtcgaCCTGTGCGAGTCGGCTGAG, posición 127 en *virF*) y pIF2 (5'-GACCAGCACACTTAGATACC, en la secuencia de ADN adyacente a 3' de *virF*), se llevó a cabo una reacción de PCR en pRAL7088. El fragmento de PCR de 780 pares de bases se clonó en el vector pT7pBlue-T (Novagen) (pSDM3194). Un fragmento *SaI/EagI* (*virF*Δ1-126) de 555 pares de bases de pSDM3194 se clonó en pSDM3179, lo que resultó en pSDM3190. La clonación de la fusión *NLS::cre::virF*Δ1-126 en el vector pRL662 como un fragmento *HindIII/XbaI* resultó en pSDM3155 (el plásmido de fusión *NLS::cre::virF*Δ1-126).

Los 113 nucleótidos del extremo 3' de *virF* se clonaron en marco con *cre*. Para este fin, pSDM3189 se transfirió como un fragmento *HindIII/XbaI* a pUC18 (Yanish-Perron y otros, Gene 33 (1985): 103-119), lo que resultó en PSDM 3172. La digestión de pSDM3172 con *XhoI* y *SaI*, la eliminación del extremo 5' cohesivo utilizando nucleasa Mung Bean seguido de autocierre del vector, dio como resultado una fusión en marco de las últimas 112 pares de bases del extremo 3' de *virF* con *cre* (pSDM3173). La transferencia de la fusión *NLS::cre::virF*Δ1-498 a pRL662 como un fragmento *XbaI/HindIII* dio como resultado el plásmido pSDM3174 (el plásmido de fusión *NLS::cre::virF*Δ1-498).

60 Los plásmidos fueron transferidos a las cepas bacterianas que se muestran en la tabla 1. Además, el plásmido pSDM3191, en el que los genes *virD3* y *virD4* se encuentran bajo el control del promotor *virD*, se movilizó en LBA1147 y LBA1150. pSDM3191 es el resultado de la clonación de un fragmento *BamHI* de 4,4 pares de kilobases de pMP3 (Vogel y Das, J. Bacteriology 174 (1992); 5161-5164) en el sitio de restricción *BamHI* de pLM997 (Melchers, no publicado), que es el resultado de la sustitución de la región T de pBin 19 (Devan y otros, Nucleic Acids Res. 12 (1984), 8711-8721) con una secuencia polienlazadora pIC19R/H (Marsh y otros, Gene 32 (1984): 481-

485).

**TABLA 1**

<b>Cepas utilizadas</b>		
Cepa	Plásmido	Marcadores de resistencia
LBA1010	pTiB6	Rif
LBA1100	pTiB6 $\Delta$ T <sub>1</sub> T <sub>r</sub> , $\Delta$ tra, $\Delta$ occ	Rif, Sp
LBA2561	pAL1100 $\Delta$ virF	Rif, Sp
LBA1142	pAL1100(virA::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1143	pAL1100(virB4::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1144	pAL1100(virB7::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1145	pAL1100(virG::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1146	pAL1100(virC2::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1147	pAL1100(virD2::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1148	pAL1100(virD4::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1149	pAL1100(virE2::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb
LBA1150	pAL1100(virD1::Tn3Hoho1)	Rif, Sp, Cb

- 5 El gen de fusión *NLS::cre::virF* también se acopló al plásmido ayudante en LBA2561 mediante la selección de cruces individuales entre las regiones de ADN homólogas que flanquean el gen *virF* y *NLS::cre::virF* (pSDM3189), lo que resultó en *LBA2561::NLS::cre::virF*.

10 Como control para la transformación de las plantas se utilizó LBA1115 (= MOG101 (Hood y otros, Transgenic Res. 2 (1993) 208-218), que es comparable con LBA1100 pero que contiene los genes *tra* y *occ*. El vector IncP de pSDM3088 (Vergunst y Hooykaas, Plant Mol. Biol. 38 (1998), 393-406), que contiene el gen *cre* bajo el control del promotor de la sintasa de manopina entre las secuencias adyacentes izquierda y derecha de *Agrobacterium* ("repeticiones del borde de ADN-T"), se transfirió a LBA1115.

#### 15 Líneas de plantas

20 El plásmido pSDM3043 (véase la figura y Vergunst y Hooykaas Plant Mol. Biol. 38 (1998), 393-406) se introdujo en C24 *Arabidopsis thaliana* por medio de la transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de raíz (Vergunst y otros, en Methods in Mol. Biol. 82 pág. 227-244 (1998)) y los transformantes fueron seleccionados por la resistencia a fosfotricina (30 mg/l). Las plantas que tienen el locus de escisión 3043 son sensibles a kanamicina. Se seleccionó una planta transformada, con segregación 3:1 para el transgén (1 locus), sobre la base de la eficacia de la escisión mediada por Cre del gen *bar* (véase la figura), flanqueado por sitios *lox* presentes en repetición directa (ver las flechas en el dibujo). La escisión mediada por Cre se podría lograr mediante la transformación de los explantes de raíz con el vector de expresión de Cre pSDM3088. Dicha escisión simultánea resultó en la reparación de un marcador de resistencia a kanamicina.

#### Transformación de plantas

30 El protocolo para la transformación de explantes de raíz de *Arabidopsis* mediados por *Agrobacterium* se ha descrito anteriormente (Vergunst y otros, En Methods in Mol. Biol. 82, pág. 227-244 (1998)). Se utilizaron raíces de plántulas de 10 días de edad que son homocigotos para el locus de escisión 3043 (T3 o T4) en los ensayos de transformación utilizando las cepas descritas en la tabla 1, que contienen las construcciones descritas anteriormente. Después de 2 días de cultivo en conjunto, los explantes se transfirieron a un medio para inducir el crecimiento de callos y brotes, cuyo medio contenía 50 mg/l de kanamicina y 100 mg/l de timentina. El número de callos resistentes a kanamicina se determinó entre 2 y 3 semanas después del cultivo en conjunto. El análisis por PCR se llevó a cabo en un número de brotes regenerados a partir de callos resistentes a kanamicina.

#### Análisis por PCR

40 El método utilizado para el aislamiento de ADN cromosómico para los análisis por PCR y el protocolo para la reacción de PCR se han descrito anteriormente (Vergunst y otros, Plant Mol. Biol. 38 (1998), 393-406). Como cebadores (a y b en el dibujo) para el análisis de callos y plantas resistentes a kanamicina se utilizaron

- 45 a) (5'-GAACTCGCCGTAAAGACTGGCG-3') que se hibrida en la región del promotor 35S (pDE35S en el dibujo), y  
 b) (5'-GCGCTGACAGCCGGAACACG-3') que se hibrida en la secuencia codificante *nptII* (ver figura). Los cebadores utilizados para la construcción de los plásmidos se mencionan en detalle.

#### Resultados

50 Para demostrar que *Agrobacterium* transfiere proteínas de fusión a células de plantas receptoras, se utilizó un

ensayo de recombinación que permite la detección del transporte de la recombinasa Cre. Para este fin, el núcleo de la célula de planta contenía un segmento de ADN, que después de la eliminación específica por Cre resulta en un rasgo de resistencia a la kanamicina seleccionable. Este sustrato para la recombinación de Cre (pSDM3043, figura 1) se transfirió mediante una transformación mediada por *Agrobacterium* en el genoma de *Arabidopsis* por medio de la selección por resistencia a fosfotricina. Las plantas transgénicas fueron sensibles a la kanamicina. Sin embargo, la recombinación mediada por Cre entre dos sitios *lox* orientados en tándem resulta en la escisión del segmento de ADN interventor, y en la activación del gen *nptII* por fusión traduccional de la región del promotor 35S que incluye el codón de inicio ATG y una parte de codificación del extremo N-terminal (determinada por la secuencia *lox*) con la región de codificación de *nptII*. Esta fusión conduce a la resistencia a la kanamicina. Por lo tanto, sólo las células en las que ha tenido lugar un evento de recombinación mediado por Cre sobreviven en el medio selectivo. Se aisló una línea de plantas, que comprende un único locus del sustrato de escisión y cuya eficiencia de escisión (tal como se mide por el número de callos resistentes a kanamicina debido a la actividad de Cre) era comparable a la de la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Esto fue ensayado mediante cultivo conjunto de la línea de plantas con una cepa de *Agrobacterium* que porta un vector binario con un ADN-T que tiene el gen *cre* controlado por una secuencia promotora fuerte (LBA1115-pSDM3088). La línea de escisión seleccionada se utilizó en ensayos adicionales para demostrar el transporte directo de proteínas, incluyendo recombinasa Cre, de *Agrobacterium* a las células de plantas. Para este fin, la recombinasa Cre se expresó bajo el control del sistema de inducción *vir* en *Agrobacterium*, ya sea solo o como una fusión N-terminal o C-terminal con VirF o VirE2, respectivamente. La expresión de las proteínas de fusión en *Agrobacterium* se ensayó mediante análisis de inmunotransferencia (datos no mostrados). Las actividad de recombinación de las proteínas de fusión se ensayó mediante la medición de la capacidad de inducir un evento de escisión en el plásmido pSDM3043, cuyo plásmido se introdujo en las cepas bacterianas pertinentes con el fin de probar este efecto (datos no mostrados).

Después del cultivo conjunto de las células de plantas mencionadas anteriormente con las cepas de *Agrobacterium* LBA1010, LBA1100, LBA1149, o LBA2561, o con un derivado de estas cepas que tienen un plásmido que expresa la recombinasa Cre (el plásmido de control *cre*), se encontró como máximo una sola superviviente en un medio selectivo. De esta manera, se obtuvo el mismo número de callos resistentes a kanamicina ("el fondo") durante el cultivo conjunto con las cepas que no expresan Cre, que durante el cultivo conjunto con las cepas de *Agrobacterium* que sí expresan la recombinasa Cre. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que bacterias que la recombinasa Cre expresada en bacterias no se transfirió a las células de las plantas.

Sin embargo, los resultados fueron totalmente diferentes cuando los experimentos se realizaron con células de *Agrobacterium* que expresan proteínas de fusión entre Cre y VirE2 o VirF. Se utilizaron cepas de *Agrobacterium* (tanto de tipo no modificada así como mutantes de la proteína Vir correspondiente) que expresan o bien fusiones C-terminal o N-terminal de Cre con VirE2 y VirF, respectivamente. Se encontró que la fusión con la región N-terminal de la proteína Vir (Cre::virE2; NLS::Cre::virF), pero no con el extremo C-terminal (VirE2::Cre; NLS::virF::Cre), era altamente eficiente en la producción de callos resistentes a kanamicina. No se observó ninguna diferencia si la fusión Cre::virF se expresó a partir del plásmido ayudante (LBA2561::NLS::cre::virF) o a partir del plásmido pRL662 (LBA2561, pRL662 NLS::cre::virF). El cultivo conjunto de cepas de *Agrobacterium* (tanto de tipo no modificada como mutante de virF) que expresan una fusión Cre::virF con una delección de los 42 aminoácidos del extremo N-terminal de virF (NLS::Cre::virFΔ1-126) dio lugar a callos resistentes a kanamicina, siendo obtenidos en una frecuencia significativamente mayor. El cultivo conjunto de una cepa que expresa una proteína de fusión entre los últimos 37 aminoácidos del extremo C-terminal de VirF y Cre (NLS::Cre::virFΔ1-498) dio como resultado un comparable número elevado de callos resistentes a kanamicina.

Como controles, las cepas que albergan los plásmidos de fusión NLS::cre::virFΔ1-126 y cre::virE2 se cultivaron en conjunto con explantes de raíces C24 de *Arabidopsis* de tipo no modificado, pero tal como se esperaba, esto no dio lugar a resistencia a la kanamicina debido a la ausencia del locus de escisión.

El análisis por PCR demostró que la resistencia a la kanamicina fue de hecho causada por el evento de escisión mediado por Cre predicho. El análisis por PCR en el ADN aislado a partir de la línea 3043 de escisión dio lugar a un fragmento de 2,3 kb (véase la figura), mientras que en muestras de ADN aislado de callos resistentes a kanamicina que se obtuvieron después de cultivo conjunto de las cepas que expresan cre::virE2 y NLS::cre::virF, se obtuvo un fragmento de 0,7 kb. Para excluir la contaminación con un vector de ADN-T que expresa cre, se realizó un análisis por PCR con cebadores que se hibridan en la región de codificación de cre. Tal como era de esperar, no se detectó ningún fragmento.

En análisis por PCR de los pocos callos obtenidos de los experimentos de control (incluidos los de los experimentos en los que el cultivo se llevó a cabo con una cepa de *Agrobacterium* que no tenía un gen *cre*) demostró que éstos eran en parte el resultado de una escisión, posiblemente debido a recombinación homóloga entre los sitios *lox* y en parte debido al crecimiento continuo de las plantas sensibles en el medio de selección ("escapes"). En este último caso, se detectó el fragmento de 2,3 kb, y no se detectó el fragmento de 0,7 kb, que indica escisión. Todos estos resultados muestran, por tanto, que *Agrobacterium* puede introducir recombinasa Cre en células de plantas, pero sólo cuando se expresa como una proteína de fusión unida al extremo N-terminal de VirE2 o VirF. La eficacia de la obtención de callos resistentes a kanamicina después del cultivo conjunto de la línea de plantas 3043 con dichas cepas de *Agrobacterium* que expresan fusiones de Cre con 161 ó 37 aminoácidos C-terminales de VirF muestra que

debe haber un dominio de transporte en los últimos 37 aminoácidos C-terminales de VirF. En vista de la función *in planta* de VirE2, virF y VirD2 mostrada anteriormente, los tres aminoácidos invariantes (motivo RPR) en el extremo C-terminal de VirF, VirD2 y VirE2 sugieren la importancia de estos aminoácidos para el transporte de las proteínas Vir hacia la planta, utilizando el sistema VirB/VirD4 (ver más adelante). La mutación de uno de los residuos R en este motivo conduce a la pérdida de la función de transporte, pero cuando se cambió el residuo P en un residuo seleccionado entre A, Q, V y S, la actividad de transporte se mantuvo intacta.

En los presentes experimentos el transporte de las proteínas de fusión, detectado como resistencia a la kanamicina después del cultivo conjunto con la línea de plantas 3043, se produce independiente de la cotransferencia de ADN-T. Esto implica una importante aplicación del sistema de transporte de proteínas, a saber, la posibilidad de efectuar una modificación en las células en ausencia de ADN-T. Además, sin embargo, la transferencia puede también ocurrir en presencia de ADN-T (que puede ser oncogénico o no), lo que amplía la aplicabilidad del sistema. Una posible aplicación puede ser la integración dirigida a sitio de ADN-T en el genoma de la célula receptora por medio del cotransporte de una recombinasa que se expresa como una proteína de fusión en la misma bacteria o en cotransformantes.

Para determinar cuál de las funciones de virulencia son esenciales para el transporte de proteínas, se transfirieron *NLS::cre::virFΔ1-126* y *cre::virE2* a un conjunto de mutantes de vir, que se enumeran en la tabla 1.

El cultivo conjunto de la línea de escisión con los mutantes de *virA*, *virB*, *virG* y *virD4*, que tienen los plásmidos de fusión, no dio lugar a la escisión mediada por Cre, mientras que los mutantes *virC*, *virD1/D2*, *virF* y *virE2* dieron lugar a callos con eficiencias comparables a las eficiencias del tipo no modificado. Por lo tanto, se puede concluir que en este sistema de modelo en el que *virA* y *virG* son responsables de la formación de VirB y VirD4, la expresión de los genes *vir* a través de los reguladores *virA* y *virG* es necesaria para el transporte. Pero, aparte de eso, sólo los genes *virB* y *virD4*, que determinan el canal de secreción de tipo IV (complejo B) y el factor de acoplamiento (VirD4), son esenciales. La ocurrencia de los homólogos de *virB* y *virD4* en otros sistemas (por ejemplo, O'Callaghan y otros, Mol. Microbiol. 33 (1999): 1210-1220) hace posible la construcción de sistemas de transporte de proteínas similares en *Agrobacterium* y otros microorganismos basados en estos sistemas homólogos. Los otros genes de virulencia, incluyendo los que codifican para las proteínas transportadas VirD2, VirE2 y VirF, parecen no ser necesarios para el transporte de las proteínas de fusión.

Para demostrar que en las mismas condiciones el *Agrobacterium* transferirá proteínas de fusión en otras células eucariotas, se llevó a cabo un ensayo de recombinación similar al descrito anteriormente con células de levadura. Las células de levadura no crecen en presencia de 5-fluoro uracilo, a menos que una recombinasa elimine el gen presente entre los sitios lox, cuyo gen codifica una proteína que convierte 5-fluoro uracilo en una sustancia que es tóxica para la célula de levadura. La recombinasa se introdujo como una proteína de fusión. Tal como era de esperar, la levadura tratada de ese modo se hizo resistente a 5-fluoro uracilo (resultados no mostrados). En estos experimentos, el transporte de la recombinasa por medio del extremo C-terminal de VirE2 y VirF se confirmó y, además, se demostró el transporte a través del extremo C-terminales de VirE3 y la proteína MobA del plásmido RSF1010 de IncQ (resultados no mostrados). En la proteína VirE3 la secuencia RPR también está presente en el extremo C-terminal, y en MobA la secuencia RQR está presente.

Secuencia núm. 1  
 Secuencia de aminoácidos de virF\_15955 (1-609)  
 Código universal  
 Número total de aminoácidos: 202, PM = 22.394  
 Max ORF: 1-606, 202 AA, PM = 22.394

ORIGEN

1	MRNSSLRDAS	GSNDAQVPHK
21	TELLNLPDHV	LTEVAKRLAT
41	NNPVESAENI	ANFSKSHRFT
61	RDAVRTEPLE	KFSSRLKILS
81	RNAKLLSHAV	RHAATLPDGE
101	QLSEAQLSQM	RSEVATRPVL
121	GVAYTHQDGQ	PEERLSGNHL
141	DHKINNIPNL	VFNVAEPIMF
161	NEISALEVMA	EVRPIARSIK
181	TAHDDARAEL	MSADRPRSTR
201	GL *	

Secuencia núm. 2  
 Secuencia de aminoácidos de VirD2\_pTi15955 (1-1275)  
 Código universal  
 Número total de aminoácidos: 424, PM = 47.476

# ES 2 427 928 T3

Max ORF: 1-1272, 424 AA, PM = 47.476

## ORIGEN

5	1	MPDRAQVIIR	IVPGGGTKTL
	21	QQIINQLEYL	SRKGGLELQR
	41	SARHLDIPVP	PDQIRELAQS
	61	WVTEAGIYDE	SQSDDDRQQD
	81	LTHIIVSFP	AGTDQTAAYE
10	101	ASREWAAEMF	GSYGGGGRYN
	121	YLTAYHVDRD	HPHLHVVVNR
	141	RELLGHGWLK	ISRRHPQLNY
	161	DGLRKKMAEI	SLRHGIVLDA
	181	TSRAERGIAE	RPITYAEHRR
15	201	LERMQAQKIQ	FEDTDFDETS
	221	PEEDRRDLSQ	SFDFFRSDPS
	241	TGEPDRATRH	DKQPLEQHAR
	261	FQESAGSSIK	ADARIRVSLE
	281	SERSAQPSAS	KIPVIGHFGI
20	301	ETSYVAEASV	RKRSGIFGTS
	321	RPVTDVAMHT	VKRQQRSKRR
	341	NDEEAGPSGA	NRKGLKAAQV
	361	DSEANVGEQD	TRDDSNKAAD
	381	PVSASIGTEQ	PEASPKRPRD
25	401	RHDGELGGRK	RARGNRRDDG
	421	RGGT *	

Secuencia núm. 3

Secuencia de aminoácidos de virE2\_pTi15955 (1-1602)

30 Código universal

Número total de aminoácidos: 533, PM = 60.502

Max ORF: 1-1599, 533 AA, PM = 60.502

## ORIGEN

35	1	MDLSGNEKSR	PWKKANVSSS
	21	TISDIQMTNG	ENLESGSPTR
	41	TEVLSPLRDD	GSVDSSSSLY
	61	IQKELSALFS	SGSEHGNQAE
40	81	NMSLPGNDRR	PDEYILVRQT
	101	GQDAFTGIAK	GNLDHMPTKA
	121	EFNACCRLYR	DGAGNYPPPP
	141	LAFDKISVPA	QLEETWGMME
	161	AKERNKLRFQ	YKLDVWNHAH
45	181	ADMGITGTEI	FYQTDKNIKL
	201	DRNYKLRPED	RYVQTERYGR
	221	REIQKRYQHE	LQAGSLLPDI
	241	MIKTPKNDIH	FVYRFAGDNY
	261	ANKQFSEFEH	TVKRRYGGET
50	281	EIKLKSXSGI	MHDSKYLESW
	301	ERGSADIRFA	EFVGENRAHN
	321	RQFPTATVNM	GQQPDGQGGL
	341	TRDRHVSVEF	LMQSAPNSPW
	361	AQALKKGELW	DRVQLLARDG
55	381	NRYLSPHRLE	YSDPEHFTEL
	401	MNRVGLPASM	GRQSHAASIK
	421	FEKFDAQAAV	IVINGPELRD
	441	IHDLSPENLQ	NVSTKDVIVA
	461	DRNENGQRTG	TYTSVAEYER
60	481	LQLRLPADAA	GVLGEADKY
	501	SRDFVRPEPA	SRPISDSRRI
	521	YESRPRSQSV	NSF *

Secuencia núm. 4

Secuencia de aminoácidos de virE3\_pTi15955 (1-2019)

65 Código universal

Número total de aminoácidos: 672, PM = 75.584

# ES 2 427 928 T3

Max ORF: 1-2016, 672 AA, PM = 75.584

## ORIGEN

5	1	MVSTTKKSFA	KSLTADMRRS
	21	AQRWEQMRK	ALITEEEALK
	41	RQTRLESPDR	KRKYAADMAI
	61	VDKLDVGFGRG	EIGYKILGNK
	81	RLRVDNPKEL	TREHGRLRKT
10	101	KTVLKRNPVT	QEVYLGHLHER
	121	KSWLSVSSHL	YAADGTLRMK
	141	HVKYKDGFRFE	ERWERDENG
	161	LIRTRYANRG	RLFQPVSEKM
	181	GAPYRSGPDN	RLYRDLTRQN
15	201	GFRRETFERD	DQGNLERIGS
	221	NHVGFSKISV	KAANRQTSQT
	241	KIQKLGGAFFN	KSFRSLLDKE
	261	GNELGRDILS	HRRLYNKRSA
	281	VYDEATGQLK	SAKHTFGKIY
20	301	RSETDYLSAG	LKKVSKKILG
	321	VTVYRKFAAL	SERESEAERL
	341	RSFESGAHRQ	IWQERAATPG
	361	SPPSESDDIH	FAQQSHLAKA
	381	NSDHVEADVM	RVTDQHIDVA
25	401	GQTSSSRQRN	LEERLDSQSR
	421	YKPANMLLSD	PDLRADGPRP
	441	YEGLAELTLR	RDNESDGHKE
	461	NDQRLRHFLQ	PEPLVLPHPG
	481	SPEITKVFGS	RGEPLHPSGT
30	501	LHTAVGETAC	EAPVMSSSLD
	521	NHQFAPGQQE	LLSLLHNAPA
	541	PVSVAIHDEQ	ERLAGEAPGG
	561	SFRGSSGRTS	SMSESIFDED
	581	VQSHLVRDYS	INPTNGFIDP
35	601	QSLFGGPDLS	RGPKSGPEIP
	621	SEDYHLSASE	QENLLNQLLS
	641	VPLPIPSPKP	KSARSMIFEG
	661	SRPRERSTSR	GF *

40 Secuencia núm. 5  
 Secuencia de aminoácidos derivada de RSF1010\_mobA (1-2130)  
 Código universal  
 Número total de aminoácidos: 709, PM = 77.847

45	1	MAIYHLTAKT	GSRSGGQSAR
	21	AKADYIQREG	KYARDMDEVL
	41	HAESGHMPEF	VERPADYWDA
	61	ADLYERANGR	LFKEVEFALP
	81	VELTLDQOKA	LASEFAQHLLT
50	101	GAERLPYTLA	IHAGGGENPH
	121	CHLMISERIN	DGIERPAAQW
	141	FKRYNGKTPE	KGGAQKTEAL
	161	KPKAWLEQTR	EAWADHANRA
	181	LERAGHDARI	DHRTLEAQQGI
55	201	ERLPGVHLGP	NVVEMEGRGI
	221	RTDRADVALN	IDTANAQIID
	241	LQFYREAIIDH	ERNRQSEEIQ
	261	RHQRVSGADR	TAGPEHGDTG
	281	RRSPAGHEPD	PAGQRGAGGG
60	301	VAESPAPDRG	GMGGAGQRVA
	321	GGSRERGEQRR	AERPERSVAGV
	341	ALEAMANRDA	GFHDAYGGAA
	361	DRIVALARPD	ATDNRGRLDL
	381	AALGGPMKND	RTLQAIGRQL
65	401	KAMGCERFDI	GVRDATTGQM
	421	MNREWSAAEV	LQNTPWPKRM
	441	NAQGNDVYIR	PAEQERHGLV

# ES 2 427 928 T3

	461	LVDDLSEFDL	DDMKAEGREP
	481	ALVVETSPKN	YQAWVKVADA
	501	AGGELRGQIA	RTLASEYDAD
5	521	PASADSRHYG	RLAGFTNRKD
	541	KHTTRAGYQP	WVLLRESK GK
	561	TATAGPALVQ	QAGQQIEQAQ
	581	RQQEKARRLA	SLELPERQLS
	601	RHRR TALDEY	RSEMAGLVKR
10	621	FGDDL SKCDF	IAAQKLASRG
	641	RS AEEIGKAM	AEASPALAER
	661	KPGHEADYIE	RTVSKVMGLP
	681	SVQLARAELA	RAPAPRQRGM
15	701	DRGGPDFSM *	.

## REIVINDICACIONES

1. Método para llevar a cabo una modificación en una célula no humana, en el que un sistema de transferencia bacteriano se pone en contacto con la célula a ser modificada, dicho sistema de transferencia tiene un sistema de transporte de proteínas que comprende un poro, el canal de secreción de tipo IV, que incluye un complejo VirB y proteína VirD4, en el que el sistema de transferencia comprende una proteína de fusión o es capaz de crear una proteína de fusión que se introduce en la célula utilizando el sistema de transporte de proteínas, en el que se introduce una proteína de fusión BA en la célula a ser modificada, cuya proteína de fusión BA comprende
- 5
- 10 i) como parte A un oligopéptido que comprende los 37 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de VirF, cuando se fusiona con cre, o los 40 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de una proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV, en el que dicha proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV se selecciona del grupo que comprende VirF, VirD2, VirE2, VirE3 y MobA; y
- 15 ii) como parte B un polipéptido capaz de ejercer una actividad de modificación celular en la célula a ser modificada;
- en el que el extremo C-terminal del polipéptido de la parte B está unido al extremo N-terminal de la parte A, con la condición de que si la proteína de fusión comprende una parte A derivada de VirE2, la proteína de fusión no comprende los 84 aminoácidos del extremo N-terminal de VirE2.
- 20
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína de fusión se forma mediante la expresión en el sistema de transferencia.
- 25
3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la proteína de fusión se introduce en la célula a ser modificada sin la introducción de una secuencia de ADN o ARN.
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la proteína de fusión introducida posee una actividad recombinasa.
- 30
5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque se utiliza una bacteria de la clase *Rhizobiaceae* como sistema de transferencia.
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la célula a ser modificada se selecciona del grupo que comprende i) una célula de plantas, ii) una célula de levaduras, y iii) una célula de hongos.
- 35
7. Vector, que codifica un sistema de transporte de proteínas bacterianas que tiene un poro, el canal de secreción de tipo IV, que incluye un complejo VirB y proteína VirD4, así como una proteína de fusión BA que comprende:
- 40 i) como parte A un oligopéptido que comprende los 37 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de VirF, cuando se fusiona con cre, o los 40 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de una proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV, en el que dicha proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV se selecciona del grupo que comprende VirF, VirD2, VirE2, VirE3 y MobA; y
- 45 ii) como parte B un polipéptido capaz de ejercer una actividad de modificación celular en la célula a ser modificada;
- en el que el extremo C-terminal del polipéptido de la parte B está unido al extremo N-terminal de la parte A, con la condición de que si la proteína de fusión comprende una parte A derivada de VirE2, la proteína de fusión no comprende los 84 aminoácidos del extremo N-terminal de VirE2.
- 50
8. Conjunto de vectores, caracterizado porque el conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican un sistema de transporte de proteínas bacterianas que tiene un poro, el canal de secreción de tipo IV, que incluye un complejo VirB y proteína VirD4, así como una proteína de fusión BA que comprende:
- 55 i) como parte A un oligopéptido que comprende los 37 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de VirF, cuando se fusiona con cre, o los 40 aminoácidos más hacia el extremo C-terminal de una proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV, en el que dicha proteína bacteriana transportada por un canal de secreción de tipo IV se selecciona del grupo que comprende VirF, VirD2, VirE2, VirE3 y MobA; y
- 60 ii) como parte B un polipéptido capaz de ejercer una actividad de modificación celular en la célula a ser modificada;
- en el que el extremo C-terminal del polipéptido de la parte B está unido al extremo N-terminal de la parte A, con la condición de que si la proteína de fusión comprende una parte A derivada de VirE2, la proteína de fusión no comprende los 84 aminoácidos del extremo N-terminal de VirE2.
- 65

Fig.

