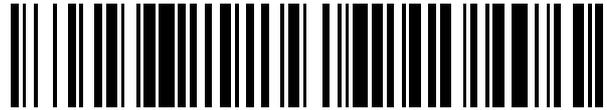


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 743**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07860889 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2235187**

54 Título: **Un método de mutagénesis mejorada utilizando polietilenglicol por introducción de bases nitrogenadas mutagénicas en protoplastos vegetales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2014

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)
P.O. BOX 216
6700 AE WAGENINGEN, NL**

72 Inventor/es:

**BUNDOCK, PAUL;
DE BOTH, MICHIEL, THEODOOR, JAN y
LHUISSIER, FRANCK**

74 Agente/Representante:

MANRESA VAL, Manuel

ES 2 450 743 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

Método de mutagénesis mejorada utilizando polietilenglicol por introducción de bases nitrogenadas mutagénicas en protoplastos vegetales.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso de mutagénesis dirigida mediante la introducción de una base nitrogenada mutágena en protoplastos vegetales utilizando polietilenglicol (PEG). La presente invención se refiere asimismo a la utilización del PEG para mejorar la mutagénesis dirigida.

10

Antecedentes de la invención

El proceso de crear deliberadamente cambios en el material genético de células vivas tiene como objetivo modificar una o más propiedades biológicas codificadas genéticamente de dicha célula o del organismo de la que forma parte la célula o en el que se puede regenerar. Dichos cambios pueden tomar la forma de delección de partes del material genético, adición de material genético exógeno o cambios en la secuencia de nucleótidos existente del material genético. Los métodos para alterar el material genético de los organismos eucariotas se conocen desde hace más de 20 años y han encontrado una amplia aplicación en las células vegetales, humanas y animales y en los microorganismos para introducir mejoras en los campos de la agricultura, la salud, la calidad de los alimentos y la protección medioambiental. Los métodos más comunes comprenden la adición de fragmentos de ADN exógeno al genoma celular, que a su vez confieren una nueva propiedad a dicha célula o a su organismo además de las propiedades codificadas por genes ya existentes (incluyendo aplicaciones en las que la expresión de los genes existentes se verá de este modo suprimida). Aunque muchos de estos ejemplos son eficaces en la obtención de las propiedades pretendidas, dichos métodos no son, sin embargo, muy precisos, ya que no existe control sobre las posiciones genómicas en las que se insertan los fragmentos de ADN exógenos (y por lo tanto en los niveles últimos de expresión) y porque el efecto pretendido deberá manifestarse por sí mismo en las propiedades naturales codificadas por el genoma original y bien equilibrado. En cambio, los procedimientos de mutagénesis dirigida, con los que se obtendrá la adición, delección o conversión de nucleótidos en locus genómicos predefinidos, permitirán la modificación precisa de los genes existentes. Además, debido a la naturaleza precisa de la mutagénesis dirigida, se espera que las nuevas estirpes vegetales obtenidas de este modo sean aceptadas más fácilmente por los consumidores.

15

20

25

30

35

40

45

La mutagénesis dirigida es un procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio que se basa en introducir en el núcleo de la célula eucariota bases nitrogenadas sintéticas mutágenas (moléculas que consisten en tramos cortos de regiones parecidas a nucleótidos que se parecen al ADN en lo que se refiere a sus propiedades de apareamiento de bases de Watson y Crick, pero que pueden ser químicamente distintas del ADN) (Alexeev and Yoon, *NatureBiotechnol.* 16: 1343, 1998; Rice, *NatureBiotechnol.* 19: 321, 2001; Kmiec, *J. Clin. Invest.* 112: 632, 2003). Una vez introducidas en la célula, dichas bases nitrogenadas mutágenas se aparean con la secuencia complementaria en el locus de actuación. Al diseñar deliberadamente un emparejamiento incorrecto de la base nitrogenada, el emparejamiento incorrecto puede provocar la conversión de un nucleótido de la posición correspondiente en la secuencia genómica de actuación. Dicho procedimiento permite la conversión de un solo o, como máximo, unos pocos nucleótidos en locus endógenos, pero se puede aplicar para crear codones de terminación en los locus existentes, obteniéndose una perturbación de su función, o para crear cambios en los codones, obteniéndose genes que codifican proteínas con una composición de aminoácidos alterada (ingeniería de proteínas).

La mutagénesis dirigida se ha descrito en células vegetales, animales y de levaduras. Se han utilizado dos clases distintas de bases nitrogenadas mutágenas sintéticas en dichos estudios, bases nitrogenadas de ADN: ARN quimérico o bases nitrogenadas monocatenarias.

50

Las bases nitrogenadas de ADN: ARN quimérico (quimeras) son moléculas auto complementarias que comprenden una única región de ADN de 25 pb y una secuencia complementaria de 25 pb constituida por 5 pb de la región central de ADN flanqueada en ambos lados por 10 pb de ARN 2'-O-metilado que se considera que contribuye a la estabilidad de la quimera en la célula. La región central de 5 pb comprende en su centro un emparejamiento incorrecto genomanipulado con el nucleótido a alterar en la secuencia del ADN genómico de actuación. Ambas regiones se encuentran unidas por horquillas de timidina de 4 pb. Se considera que al introducir la quimera en la célula forma un asa D doble con su secuencia de acceso y se forma un emparejamiento incorrecto entre la quimera y el nucleótido de actuación. Dicho emparejamiento incorrecto lo resuelven a continuación las proteínas de reparación del ADN celular endógenas mediante la conversión del nucleótido genómico. Los primeros ejemplos de mutagénesis dirigida utilizando quimeras se obtuvieron en células animales (revisado Igoucheva *et al.* 2001 *Gene Therapy* 8, 391-399) y se utilizaron asimismo posteriormente para obtener una mutagénesis dirigida en células vegetales (Beethamet *et al.* 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8774-8778; Zhu *et al.* 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8768-8773; Zhu *et al.* 2000 *NatureBiotech.* 18, 555-558; Kochevenko *et al.* 2003 *PlantPhys.* 132: 174-184; Okuzakiet *al.* 2004 *PlantCell Rep.* 22: 509-512). A diferencia de las células humanas, una célula vegetal en la que se ha producido una mutagénesis dirigida se puede regenerar en una planta intacta y transferir la mutación a la

55

60

65

generación siguiente, por lo que es una herramienta ideal tanto para la investigación como para la mutagénesis comercial de cultivos alimentarios importantes. Sin embargo, una amplia investigación realizada por muchos laboratorios ha demostrado que la frecuencia de la mutagénesis dirigida utilizando quimeras es bastante baja y variable, o incluso inapreciable (Ruiter *et al.* 2003 *Plant Mol. Biol.* 53, 715-729, Van der Steege *et al.* (2001) *Nature Biotech.* 19: 305-306), y que depende de factores tales como el estado transcripcional del objetivo, el estado de la célula en el ciclo celular, la secuencia del objetivo y la calidad de las quimeras, que resultan difíciles de sintetizar. Debido a la frecuencia relativamente baja de mutagénesis dirigida con los métodos conocidos en la técnica, dichos eventos se pueden detectar únicamente cuando la alteración de un solo nucleótido del objetivo genómico tiene como resultado un fenotipo dominante que se pueda seleccionar. Se introdujeron en células vegetales mutaciones puntuales específicas en el marco de lectura abierto del gen de la acetolactosintasa (ALS, en el AHAS de maíz) que cataliza la etapa inicial común de la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina. En el tabaco, las alteraciones de nucleótidos individuales resultan suficientes para producir las conversiones de los codones P194Q o W571 L. La proteína ALS producida tras cualquiera de dichas conversiones de codones es insensible a la inhibición mediante la clase de herbicidas de las sulfonilureas, proporcionando de este modo un procedimiento de selección para las conversiones de un solo nucleótido en un locus cromosómico.

Debido a las dificultades de trabajar con quimeras, se han buscado diseños de oligonucleótidos alternativos más fiables. Diversos laboratorios han investigado la capacidad de las bases nitrogenadas monocatenarias (ss) para realizar la mutagénesis dirigida. Se ha descubierto que estas permiten obtener unos resultados más reproducibles, son más fáciles de sintetizar y pueden comprender asimismo nucleótidos modificados para mejorar el rendimiento de la base nitrogenada mutágena en la célula (Liu *et al.* 2002 *Nucl. Acids Res.* 30: 2742-2750; revisión, Parekh-Olmedo *et al.* 2005 *Gene Therapy* 12: 639-646; Dong *et al.* 2006 *Plant Cell Rep.* 25. 457-65; De Piedouee *et al.* 2007 *Oligonucleotides* 27: 258-263).

La mutagénesis dirigida se ha descrito en diversas solicitudes de patente a nombre de Kmiec, entre otros, en los documentos WO0173002, WO03/027265, WO01/87914, WO99/58702, WO97/48714, WO02/10364. En el documento WO 01/73002 se describe que se considera ampliamente que la baja eficiencia de la alteración genética obtenida utilizando bases nitrogenadas sin modificar se debe a su degradación por las nucleasas presentes en la mezcla de la reacción o en la célula elegida como objetivo. Para solucionar dicho problema, se propone incorporar nucleótidos modificados que provocan que las bases nitrogenadas resultantes sean resistentes a las nucleasas. Los ejemplos típicos de dichos nucleótidos modificados comprenden enlaces fosforotioato o análogos 2'-O-metilo. Dichas modificaciones se encuentran preferentemente en los extremos de la base nitrogenada, dejando un dominio central sin modificar que rodea la base de actuación. Apoyando lo anterior, la solicitud de patente WO 02/26967 demuestra que ciertos nucleótidos modificados que aumentan la duración intracelular de la base nitrogenada mejoran la eficiencia de la mutagénesis dirigida en un sistema de ensayo *in vitro* y asimismo en un objetivo cromosómico de mamífero. No únicamente la resistencia a las nucleasas, sino asimismo la afinidad de enlace de una base nitrogenada mutágena con respecto a su ADN de actuación complementario tiene el potencial para aumentar drásticamente la frecuencia de mutagénesis dirigida. Una base nitrogenada ss que contenga nucleótidos modificados que aumenten su afinidad de enlace puede encontrar más eficientemente su objetivo complementario en un genoma complejo y/o permanecer enlazada con su objetivo durante más tiempo y será menos propensa a que la eliminen las proteínas que regulan la transcripción y la replicación del ADN. Se ha utilizado un ensayo *in vitro* de mutagénesis dirigida para analizar muchos nucleótidos modificados a fin de mejorar la eficiencia del proceso de la mutagénesis. Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y las pirimidinas C5-propino presentan modificaciones en la parte glucídica y la base, respectivamente, que estabilizan la formación de la doble cadena y elevan la temperatura de fusión de la doble cadena. Cuando dichos nucleótidos modificados se incorporan a una base nitrogenada ss, aumentan la eficiencia de la mutagénesis dirigida hasta 13 veces con respecto a la obtenida utilizando una base nitrogenada no modificada de la misma secuencia. Véanse en este sentido los documentos WO2007073166 y WO2007073170 a nombre de los presentes solicitantes.

Los presentes inventores han propuesto mejorar la frecuencia de la mutagénesis dirigida en células vegetales optimizando el método utilizado para introducir las bases nitrogenadas mutágenas en las células vegetales. En el procedimiento utilizado más ampliamente en la transformación de células vegetales, la transformación en la que interviene *Agrobacterium*, se transfiere una sección de su plásmido inductor de tumores (Ti), el denominado ADN-T, a las células vegetales donde se integra eficientemente en el genoma de la planta en una posición aleatoria. El ADN-T se encuentra flanqueado en ambos extremos por secuencias de "frontera" de hasta 22 pb obtenidas del plásmido Ti que no comparten homología alguna con la secuencia seleccionada. Dada la corta longitud de las bases nitrogenadas mutágenas ss utilizadas en la mutagénesis dirigida, las secuencias de frontera interferirían con el proceso. Por lo tanto, únicamente se puede alcanzar la mutagénesis dirigida en células vegetales mediante la transferencia directa de ADN utilizando procedimientos químicos o físicos.

En las publicaciones, se han descrito varias de dichas técnicas de transferencia directa de ADN y comprenden la electroporación, el tratamiento con polietilenglicol (PEG) de los protoplastos, el bombardeo biolístico del material de callos vegetales y la micro inyección de ADN en protoplastos o tejidos individuales. La técnica no proporciona indicación alguna en lo que se refiere a un procedimiento preferido para la transferencia de bases nitrogenadas ss para la mutagénesis dirigida, en particular para la transferencia de ADN a los vegetales o protoplastos vegetales.

Para obtener la mayor eficiencia posible de una mutagénesis dirigida en vegetales, los presentes inventores han identificado durante sus investigaciones cuatro factores que se han de optimizar. En primer lugar, se introduce preferentemente la base nitrogenada mutágena con una eficiencia de transformación elevada, es decir, se introduce en el mayor número posible de células vegetales. En segundo lugar, el tratamiento es preferentemente no letal para la mayoría de las células, lo que garantiza que el mayor número de células posible que se transforman también sobreviven al procedimiento de transformación (eficiencia de supervivencia). En tercer lugar, el procedimiento de transformación es preferentemente no perjudicial para las divisiones posteriores de las células vegetales transformadas para formar microcallos (eficiencia de regeneración / siembra) y, por último, preferentemente es posible identificar plantas regeneradas individuales obtenidas de eventos de mutagénesis dirigida sin la aplicación de una selección (eficiencia de identificación).

La mayoría de los procedimientos de transformación de ADN a células vegetales individuales utilizan protoplastos, obtenidos directamente de las hojas (protoplastos del mesófilo) o a partir de suspensiones celulares (revisado en Sheen, J. (2001) *PlantPhys.* 127: 1466-1475). Los protoplastos se pueden utilizar en estudios de expresión transitoria, en cuyo caso la expresión de genes o la localización de proteínas se pueden analizar poco después de la transformación, o en la producción de plantas transformadas de un modo estable cuando los protoplastos se cultivan en un medio destinado a estimular la formación callos y la organogénesis.

Se ha descrito previamente la transformación de protoplastos vegetales utilizando electroporación (Fromm *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828; Nishiguchiet *al.* (1986) *PlantCell Rep.* 5: 57-60; Ou-Lee *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6815-6819; Hauptmannet *al.* (1987): *PlantCell Rep.* 6: 265-270; Jones *et al.* (1989). *Plant Mol. Biol.* 13: 503-511). En general, la intensidad de campo (V/cm) que proporciona los resultados más elevados de eficiencia de transformación tiene como resultado < 50% de la supervivencia de los protoplastos (Jones *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 13: 503-511). En los estudios de electroporación con tabaco se ha descubierto que solo aproximadamente el 10% de los protoplastos de tabaco totales de la muestra se transforman con un plásmido que expresa la GFP y dicha eficiencia relativamente baja transformación se ha observado asimismo tras la electroporación de protoplastos de *Arabidopsis* (Miao *et al.* (2007) *NatureProtocols* 10: 2348-2353). En general, las condiciones óptimas de electroporación se deben determinar empíricamente para cada especie vegetal y estas también pueden variar según el tipo de máquina de electroporación y el procedimiento y las disoluciones amortiguadoras utilizadas en el aislamiento de los protoplastos. Aunque la electroporación se ha aplicado satisfactoriamente a muchas especies vegetales, continúa siendo una técnica difícil con varias limitaciones importantes (tal como se comenta en: <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/fag.html>), en particular en lo que se refiere a la reproducibilidad. Por ello la electroporación es menos conveniente para mejorar la eficacia global de la TNE de la mutagénesis dirigida.

La transferencia directa de genes utilizando una distribución biolística ha resultado muy satisfactoria en la generación de vegetales de cultivos transgénicos y se utiliza de un modo rutinario en la integración estable de transgenes. Se transfieren las suspensiones celulares a un medio sólido para provocar la formación de callos y dicho material se bombardea con partículas de oro accionadas por una fuente de gas a alta presión. Se ha descrito que las frecuencias de transformación son bajas, se transforman -0,01% del total de células. Debido a la baja eficiencia de transformación, la supervivencia de las células transformadas es difícil de valorar. En cambio, la eficiencia de regeneración tras el bombardeo es probablemente elevada debido al material muy dividido que se trata. Sin embargo, ya que se producirá la TNE en una sola célula de un solo callo, dicho evento se pierde con facilidad si no se selecciona o, alternativamente, las plantas regeneradas serán quiméricas para la mutagénesis dirigida. Por lo tanto, el bombardeo no es práctico para realizar la mutagénesis dirigida en locus no seleccionables. En cambio, se pueden recuperar eventos de mutagénesis dirigida utilizando protoplastos ya que cada microcallo procede de un único protoplasto.

Las conversiones provocadas de nucleótidos simples mediante quimeras en ALS han demostrado que la mutagénesis dirigida se puede detectar en células de tabaco, maíz y arroz. Se ha utilizado el bombardeo en el tabaco (Beethamet *al.* 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8774-8778; Kochevenkoet *al.* 2003 *PlantPhys.* 132: 174-184), el maíz (Zhu *et al.* 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8768-8773) y el arroz (Okuzakiet *al.* 2004 *PlantCell Rep.* 22: 509-512). Beethamet *al.* (1999) publicaron que la frecuencia de resistencia a los herbicidas tras la transferencia directa de quimeras aumentó 20 veces en comparación con el índice de mutación de fondo (que se supone de 10^{-7} a 10^{-8}). Kochevenkoet *al.* han utilizado también la electroporación para realizar experimentos de mutagénesis dirigidas en protoplastos de mesófilos de tabaco. Los presentes inventores pudieron obtener callos del tabaco resistentes a los herbicidas con una frecuencia del 0,0001%, comparable a la frecuencia obtenida por Beethamet *al.* Ello indica que cuando se trata de las mismas especies vegetales y los mismos nucleótidos de actuación, en este caso el procedimiento de distribución directa del ADN no tiene un gran impacto en la eficiencia de la mutagénesis dirigida, que permanece en un nivel bajo no pretendido. Sin embargo, Ruiteret *al.* (2003 *Plant Mol. Biol.* 53, 715-729) realizaron experimentos de tanto bombardeos como de electroporación en el tabaco y aceite de semillas de colza, y no pudieron detectar efecto alguno de las quimeras.

Se ha publicado el bombardeo de callos de maíz y de arroz con una eficiencia del 0,01 % de las células que se transformaron (Zhu *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8768-8773; Okuzakiet *al.* (2004) *PlantCell Rep.* 22: 509-512). Sin embargo, ello es únicamente factible en los locus seleccionables.

5 La transformación de protoplastos con PEG en sí se conoce desde 1985. El primer método de transformación de protoplastos utilizó PEG (Krenset *al.* (1982) *Nature* 296: 72-74; Potyrykuset *al.* (1985) *Plant Mol. Biol. Rep.* 3: 117-128; Negrutiet *al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 8: 363-373). La técnica se puede aplicar a protoplastos de muchos vegetales distintos (Rasmussen *et al.* (1993) *PlantSci.* 89: 199-207). Se considera que el PEG estimula la transformación por precipitación del ADN, en presencia de cationes divalentes, sobre la superficie de los protoplastos desde donde se internaliza (Maas&Werr (1989) *PlantCell Rep.* 8: 148-151). La transformación con PEG es el procedimiento a elegir para la transformación de protoplastos de *Arabidopsis* (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/fag.html>) (Mathuret *al. Methods in molecular biology*, vol. 82, 267-276) y se ajusta bien a los cuatro requisitos definidos para un procedimiento de transformación para una TNE eficiente. Cuando se tratan los protoplastos de tabaco PEG, se puede detectar un oligonucleótido ss marcado con biotina en todas las células examinadas. La supervivencia, analizada mediante tinción vital utilizando diacetato de fluoresceína, es > 90% tras el tratamiento con PEG. No todos los protoplastos conservan la capacidad de dividirse y formar microcallos. En un aislamiento normal de protoplastos de tabaco sin tratar, aproximadamente el 25% forma microcallos. El tratamiento con PEG tiene un ligero impacto en la eficiencia de regeneración, que se reduce en aproximadamente un 10%, pero este no es un valor considerable en comparación con otros procedimientos de transformación. Ninguna de las técnicas anteriores descritas previamente ha tenido en cuenta la utilización de la transformación con PEG para la mutagénesis dirigida al sitio, en particular la TNE.

Los presentes inventores han propuesto mejorar el procedimiento de transferencia directa de ADN para obtener una mutagénesis dirigida eficiente en células vegetales. Los presentes inventores han descubierto que entre las tecnologías de transformación descritas en la presente memoria, la transformación de protoplastos con PEG aumenta la eficiencia global de la mutagénesis dirigida significativamente en comparación con la electroporación y la biolística. Ello resulta sorprendente, ya que las tecnologías de mutagénesis dirigida en vegetales hasta la fecha parecen favorecer electroporación con las bajas eficiencias correspondientes. Además, la mayoría de mejoras en la tecnología se orientaron a mejorar las bases nitrogenadas mutágenas y el sistema de distribución para suministrar la base nitrogenada mutágena con el ADN genómico seleccionado.

Para poder comparar, los presentes inventores utilizaron una base nitrogenada mutágena ss diseñada para producir una conversión P194Q en el locus ALS que produce resistencia a los herbicidas. Se introdujeron bases nitrogenadas mutágenasss idénticas en protoplastos de mesófilos de tabaco tanto utilizando la transformación con PEG o la electroporación y se seleccionaron las células resistentes a los herbicidas utilizando unas condiciones de selección idénticas. De este modo, los presentes inventores han descubierto que la transformación con PEG de células vegetales es el procedimiento más eficaz para realizar la mutagénesis dirigida en células vegetales en comparación con procedimientos conocidos de transformación.

40 En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia bicatenaria de ADN aceptor en un protoplasto de una célula vegetal, que comprende la combinación de la secuencia bicatenaria de ADN aceptor con una base nitrogenada mutágena ss, comprendiendo la secuencia bicatenaria de ADN aceptor una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es complementaria de la primera secuencia de ADN y comprendiendo la base nitrogenada mutágena ss dadora por lo menos un emparejamiento incorrecto con respecto a la secuencia bicatenaria de ADN aceptor a alterar, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, comprendiendo el procedimiento además una etapa de introducción de la base nitrogenada mutágena ss en los protoplastos celulares utilizando una transformación con polietilenglicol (PEG).

La base nitrogenada mutágena ss se pone en contacto con protoplastos de la planta a transformar utilizando una tecnología basada en la transformación con PEG. La tecnología de transformación con PEG es ampliamente conocido de por sí y, en caso de ser necesarias, los expertos en la materia pueden realizar pequeñas modificaciones de protocolos particulares sin apartarse de la esencia de la presente invención.

La base nitrogenada mutágena ss utilizada en la presente invención tienen una longitud que concuerda con otra base nitrogenada mutágena ss (quimérica) utilizada en la mutagénesis dirigida, es decir, comprendida normalmente entre 10 y 60 nucleótidos, preferentemente entre 20 y 55 nucleótidos, más preferentemente entre 25 y 50 nucleótidos. En ciertas formas de realización de la presente invención, se puede modificar la base nitrogenada mutágena ss utilizada en la presente invención, por ejemplo, mediante modificaciones con LNA y/o propinilo tal como se describe en los documentos WO2007073166 y WO2007073170 a nombre del solicitante. De este modo, en ciertas formas de realización, la base nitrogenada mutágena ss contiene al menos un LNA situado en una posición que procede del emparejamiento incorrecto dirigido y preferentemente dos LNA localizados en por lo menos un nucleótido eliminado desde ambos lados del emparejamiento incorrecto. Además, dichos LNA son por lo menos 3, 4 o 5 nucleótidos eliminados de los extremos 5' y/o 3' de la base nitrogenada mutágena ss. En ciertas formas de realización, la base nitrogenada mutágena ss puede comprender una o más sustituciones de propino, tal como se describe sustancialmente en los documentos WP2007073166 y WO2007073170. En ciertas formas de realización, la base nitrogenada mutágena ss dadora puede conjugarse con una proteína tal como una señal de localización

nuclear. En dicha forma de realización, el oligonucleótido utilizado en la presente invención se acopla mediante la tecnología convencional (conector) a una señal de localización nuclear tal como el péptido conocido (NLS) del antígeno T grande SV40, el factor 11 de la transcripción GATA, la helicasaXBP1 de reparación del ADN, proteína DET1 sensible a la luz, el factor de transcripción ERF, el activador de la transcripción PT16 relacionado con PR y la proteína espiral nuclear, sustancialmente tal como se describe en la solicitud de patente en trámite PCT/NL2007/000279 a nombre de los presentes solicitantes. La señal de localización del conjugado oligonucleótido - nuclear se puede utilizar en la metodología de transformación con PEG descrita en la presente memoria.

La alteración producida mediante el procedimiento de la presente invención es una delección, una sustitución o una inserción de por lo menos un nucleótido. Preferentemente, la alteración es una sustitución. Preferentemente, la alteración es una sustitución. Se pueden alterar más nucleótidos de un oligonucleótido, pero se espera que disminuya la eficiencia, por lo que se prefiere alterar un nucleótido.

El ADN de actuación (o ADN aceptor bicatenario) puede proceder de cualquier fuente, pero preferentemente el ADN de actuación es de un vegetal. Preferentemente, el ADN de actuación procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos o ADN episómico. El procedimiento según la presente invención se puede utilizar para alterar una célula, corregir una mutación restaurando el tipo natural, introducir una mutación, inactivar un enzima disgregando la región de codificación, modificar la bioactividad de un enzima alterando la región de codificación o modificar una proteína disgregando la región de codificación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de la transformación con PEG para aumentar la eficiencia de la mutagénesis dirigida en protoplastos vegetales.

Sin limitarse por la teoría, se considera que la utilización de la transformación con PEG precipita el ADN en la membrana celular del protoplasto. El ADN precipitado se encapsula mediante la membrana celular y se introduce protegido en el protoplasto. El protoplasto, durante su ciclo celular normal, directamente tras su formación eliminando la pared celular, iniciará su proceso normal de regeneración de la pared celular. Normalmente, la división celular empieza más tarde (entre varias horas y unos pocos días). El intercambio de nucleótidos dirigido tiene lugar generalmente durante la división celular, utilizando el mecanismo de la reparación celular. En el período de tiempo entre la introducción del ADN dador en el protoplasto y el inicio de la división celular, el ADN dador es propenso al ataque de los mecanismos de defensa celular, tales como las exonucleasas, y es probable que degenere y, por lo tanto, se vuelva inefectivo para la TNE. Al utilizar la tecnología de transformación con PEG, el ADN dador se encapsula mediante endocitosis y se protege de este modo, por lo menos temporalmente, de la acción degenerativa de las endonucleasas. Cuando se libera el ADN de su forma encapsulada, tiene más posibilidades de estar presente en, o aproximadamente en, el momento de la división celular, durante el que el ADN (es decir, la base nitrogenada mutágena ss) se encuentra disponible para encontrar su complemento en el ADN de la célula aceptora e intercambiar los nucleótidos tal como en los mecanismos comunes de mutagénesis dirigida.

Ejemplos:

Comparación de las frecuencias de mutagénesis dirigida utilizando la transformación con PEG o la electroporación

Aislamiento de protoplastos

Se mantuvieron unos cultivos de brotes *in vitro* de *Nicotianatabacum* cv Petit Habana estirpe SRI en un medio MS20 con agar Difco al 0,8% en frascos de vidrio altos en el fotoperíodo de 16/8 h con 2000 lux a 25 °C y una humedad relativa (HR) del 60 al 70%. El medio MS20 es un medio básico de Murashige y Skoog (Murashige, T. and Skoog, F., *PhysiologiaPlantarum*, 15: 473-497, 1962) que contiene un 2% (p/v) de sacarosa, sin adición de hormonas, y agar Difco al 0,8%. Se cosecharon cultivos de brotes de hojas totalmente expandidas de 3 a 6 semanas. Se cortaron las hojas en tiras finas de 1 mm, que se transfirieron a continuación a placas de Petri grandes (100 mm x 100 mm) que contenían 45 ml de medio basal MDE para un tratamiento de preplasmolisis de 30 min. El medio basal MDE contenía 0,25 g de KCl, 1,0 g de MgSO₄·7H₂O, 0,136 g de KH₂PO₄, 2,5 g de povidona (PM 10.000), 6 mg de ácido naftalenoacético y 2 mg de 6-bencilaminopurina en un volumen total de 900 ml. Se ajustó la osmolalidad de la solución a mOsm.kg⁻¹ con sorbitol, a un pH de 5,7. A continuación se añadieron 5 ml de la reserva enzimática SR1. La reserva enzimática que consistía en 750 mg de celulasaOnozukaR10, 500 mg de driselasa y 250 mg de macerozimaR10 por 100 ml, se filtró en papel Whatman y se esterilizó por filtración. Se dejó proceder la digestión durante la noche en la oscuridad a 25 °C. Las hojas digeridas se filtraron a través de tamices de nilón de 50 µm en un vaso de precipitados estéril. Se utilizó un volumen equivalente de medio de lavado frío de KCl para lavar el tamiz y se agrupó con la suspensión de protoplastos. El medio de lavado de KCl consistía en 2,0 g de CaCl₂·2H₂O por litro y una cantidad suficiente de KCl para desplazar la osmolalidad hasta 540 mOsm.kg⁻¹. Se transfirió la suspensión a tubos de 10 ml y los protoplastos se sedimentan durante 10 min a 85x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron cuidadosamente los gránulos de protoplastos en 5 ml de medio de lavado frío MLm, que son macronutrientes de medio MS (Murashige, T. and Skoog, F., *PhysiologiaPlantarum*, 15: 473-497, 1962) a la mitad de la concentración normal, 2,2 g de CaCl₂·2H₂O por litro y una cierta cantidad de manitol para desplazar la osmolalidad

hasta 540 mOsm.kg⁻¹. Se combinó el contenido de los tubos 2 y se centrifugó durante 10 min a 85x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron cuidadosamente los gránulos de protoplastos en 5 ml medio de lavado frío MLs que es un medio MLm con el manitol sustituido por sacarosa.

5 Se agrupó el contenido de los tubos 2 y se añadió 1 ml de medio de lavado de KCl encima de la disolución de sacarosa teniendo cuidado en no alterar la fase inferior. Se centrifugaron los protoplastos durante 10 min a 85x g a 4 °C. Se recogió cuidadosamente la interfase entre la sacarosa y las disoluciones de KCl que contenían los protoplastos vivos. Se añadió un volumen equivalente de medio de lavado de KCl y se mezcló cuidadosamente. Se determinó la densidad de protoplastos con un hemocitómetro.

10

Transformación con PEG

15 Se centrifugó la suspensión de protoplastos a 85x g durante 10 minutos a 5 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de protoplastos a una concentración final de 10⁶.ml⁻¹ en medio de lavado de KCl. En un tubo de 10 ml, se mezclaron con cuidado pero completamente 250 µl de suspensión de protoplastos, 1,6 nmoles de base nitrogenada mutágena ss y 250 µl de disolución de PEG. Tras 20 min. de incubación a temperatura ambiente, se añadieron gota a gota 5 ml de Ca(NO₃)₂ 0,275 M frío. Se centrifugó la suspensión de protoplastos durante 10 min a 85x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el sedimento de protoplastos en 1,25 ml de un de medio de cultivo Toenriquecido con 50 µg.ml⁻¹ de cefotaxima y 50 µg.ml⁻¹ de vancomicina. El medio de cultivo de la base nitrogenada mutágena ss contenía (por litro, a un pH de 5,7) 950 mg de KNO₃, 825 mg de NH₄NO₃, 220 mg de CaC₁₂.2H₂O, 185 mg de MgSO₄.7H₂O, 85 mg de KH₂PO₄, 27,85 mg de FeSO₄.7H₂O, 37,25 mg de Na₂EDTA.2H₂O, los micronutrientes según el medio de Heller (Heller, R., *Ann SciNatBotBioVeg* 14: 1-223, 1953), vitaminas según el medio de Morel y Wetmore (Morel, G. and R.H.Wetmore, *Amer. J. Bot.* 38: 138-40, 1951), sacarosa al 2% (p/v), 3 mg de ácido naftalenoacético, 1 mg de 6-bencilaminopurina y una cierta cantidad de manitol para desplazar la osmolalidad hasta 540 mOsm.kg⁻¹.

25

30 Se transfirió la suspensión a una placa de Petri de 35 mm. Se añadió un volumen equivalente de medio de agarosa To y se mezcló cuidadosamente. Se incubaron las muestras a 25 °C en la oscuridad y se continuaron cultivando tal como se describe a continuación.

30

Electroporación (comparativa)

35 Se centrifugaron los protoplastos a 85x g durante 10 minutos a 5 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una disolución amortiguadora de electroporación enfriada en hielo que consistía en HEPES 10 mM, NaCl 80 mM, CaCl₂ 0,04 mM, manitol 0,4 M, a un pH de 5,7 ajustado a 540 mOsm.Kg⁻¹ con manitol hasta una concentración final de 10⁶ ml⁻¹. Se mantuvieron los protoplastos en hielo durante todo el procedimiento. Se añadieron 4,5 nmoles de base nitrogenada mutágena ss y 700 µl de suspensión de protoplastos a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de ancho. Se proporcionó a la suspensión celular un único impulso de degradación exponencial utilizando un sistema de electroporación Biorad GenePulser XCell equipado con un módulo de PC y CE según los siguientes parámetros:

40

Intensidad de campo 500 V.cm⁻¹
Capacitancia 950 µF

45

45 En dichas condiciones, la resistencia de la muestra es de aproximadamente 30 ohmios y la constante de tiempo resultante de aproximadamente 30 ms. Dichos parámetros se seleccionaron como los parámetros que proporcionan el máximo nivel de expresión transitoria de GFP en protoplastos de tabaco, 24 horas después de la electroporación. Tras los impulsos, se dejaron recuperar los protoplastos en la cubeta a temperatura ambiente durante 30 min. Los protoplastos se recuperaron a continuación en 1 ml de medio de cultivo T₀ y se transfirieron a un tubo de ensayo de 10 ml. Se lavó la cubeta con 5 ml adicionales de un medio de cultivo T₀ que se combinó con la suspensión de protoplastos. Tras realizar una mezcla completa y cuidadosa, se añadieron 50 µg.ml⁻¹ de cefotaxima y 50 µg.ml⁻¹ de vancomicina, y 1,25 ml de la suspensión de protoplastos se transfirieron a una placa de Petri de 35 mm. Se añadió un volumen equivalente de medio de agarosa T₀ y la mezcla se homogeneizó cuidadosamente. Se incubaron las muestras a 25 °C en la oscuridad y se continuaron cultivando tal como se describe a continuación.

55

Cultivo de protoplastos

60 Tras 10 días de cultivo, se cortó la tabla de agarosa en 6 partes iguales y se transfirió a una placa de Petri que contenía 22,5 ml de medio MAP1AO enriquecido con clorsulfurón 20 nM. Dicho medio consistía en (por litro, a un pH de 5,7) 950 mg de KNO₃, 825 mg de NH₄NO₃, 220 mg CaCl₂.2H₂O, 185 mg de MgSO₄.7H₂O, 85 mg de KH₂PO₄, 27,85 mg de FeSO₄.7H₂O, 37,25 mg de Na₂EDTA.2H₂O, los micronutrientes según el medio de Murashige y Skoog (Murashige, T. and Skoog, F., *PhysiologiaPlantarum*, 15: 473-497, 1962) a un décimo de su concentración original, vitaminas según el medio de Morel y Wetmore (Morel, G. and R.H. Wetmore, *Amer. J. Bot.* 38: 138-40, 1951), 6 mg de piruvato, 12 mg tanto de ácido málico, como de ácido fumárico y de ácido cítrico, sacarosa al 3% (p/v), manitol al 6% (p/v), 0,03 mg de ácido naftalenoacético y 0,1 mg de 6-bencilaminopurina. Se incubaron las muestras a 25 °C

65

con poca luz durante 6 a 8 semanas. A continuación se transfirieron los callos en crecimiento a un medio MAP1 y se dejaron desarrollar durante otras 2 a 3 semanas. El medio MAP₁ presenta la misma composición que el medio MAP₁AO sin embargo con manitol al 3% (p/v) en lugar del 6 %, y 46,2 mg.l⁻¹ de histidina (a un pH de 5,7). Se solidificó con agar Difco al 0,8% (p/v). Los callos se transfirieron a un medio RP utilizando pinzas estériles. Dicho medio RP consistía en (por litro, a un pH de 5,7) 273 mg de KNO₃, 416 mg de Ca(NO₃)₂·4H₂O, 392 mg de Mg(NO₃)₂·6H₂O, 57 mg de MgSO₄·7H₂O, 233 mg de(NH₄)₂SO₄, 271 mg de KH₂PO₄, 27,85 mg de FeSO₄·7H₂O, 37,25 mg de Na₂EDTA·2H₂O, los micronutrientes según el medio de Murashige y Skoog a un quinto de la concentración publicada, vitaminas según el medio de Morel y Wetmore (Morel, G. and R.H. Wetmore, *Amer. J. Bot.* 38: 138-40, 1951), sacarosa al 0,05% (p/v), manitol al 1,8% (p/v), 0,25 mg de zeatina y clorsulfurón 41 nM, y se solidificó con agar Difco al 0,8 % (p/v). Los brotes maduros se transfirieron a un medio de enraizamiento al cabo de 2 a 3 semanas.

Bases nitrogenadas mutágenas ss

15 Todas las bases nitrogenadas mutágenas ss las sintetizó Eurogentec (Seraing, Bélgica), se purificaron mediante HPLC de fase inversa y se resuspendieron en agua MilliQ estéril. Antes de su utilización, se calentaron las bases nitrogenadas mutágenas ss hasta 95 °C durante 5 min. La base nitrogenada mutágenas 06Q262 se diseñó para introducir un único emparejamiento incorrecto (nucleótido subrayado) en el gen ALS del tabaco (número de acceso X07644) en la posición del codón P194 que provocó una conversión de CCA a CAA (P194Q). La base nitrogenada mutágenas 06Q261 es la coincidencia exacta con la secuencia del gen ALS del tabaco y sirve de control negativo. La base nitrogenada mutágenas 06Q263 consiste en una combinación aleatoria de 40 nucleótidos y sirve de control negativo.

25 06Q261 5' TCAGTACCTATCATCCTACGTTGCACTTGACCTGTTATAG [SEC ID 1]
06Q262 5' TCAGTACCTATCATCCTACGTTGCACTTGACCTGTTATAG [SEC ID 2]
06Q263 5' ATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCG [SEC ID 3]

Supervivencia de protoplastos por tratamiento

30 Se analizó la supervivencia de los protoplastos tras la transformación con PEG y la electroporación mediante la actividad esterasa utilizando una tinción vital fluorescente de diacetato de fluoresceína (FDA), 24 horas tras la transformación. Se añadieron dos µl de una reserva de 5 mg.ml⁻¹ de FDA en acetona a 1 ml de protoplastos transformados. Se realizó el recuento de la proporción de protoplastos con fluorescencia en toda la población con un hemocitómetro. Se realizaron las observaciones con un microscopio de epifluorescencia vertical Nikon Eclipse E600
35 equipado con un conjunto de filtros GFP LP (EX480/40, DM505, BA510). Se proporcionó la excitación mediante una lámpara de mercurio de hiperpresión de 100 W. Se captaron las imágenes utilizando una cámara DS-2MBWc CCD conectada a un controlador DS-U1 conectado a un PC con el software de captura / análisis de imágenes NIS Element.

Resultados

45 En la tabla 1 se presenta un resumen de los resultados de la transformación utilizando tanto la transformación con PEG como la electroporación. La transformación con PEG presenta un índice de supervivencia de los protoplastos significativamente superior en comparación con la electroporación. La propia naturaleza de la electroporación es más perjudicial para la supervivencia de los protoplastos que la transformación con PEG, obteniéndose un índice de recuperación / supervivencia muy superior, así como una eficiencia de mutagénesis dirigida superior. La eficiencia de mutagénesis dirigida se obtuvo tras incubar los protoplastos en presencia de clorsulfurón.

50 **Tabla 1:** Comparación de la transformación con PEG y la electroporación con respecto a los índices de supervivencia de protoplastos.

Base nitrogenada mutágena	Tratamiento con PEG	Electroporación (ejemplo comparativo)
	Supervivencia** (%)	Supervivencia** (%)
06Q261	83,5±1,8	65,9±2,2
06Q262	82,6±2,1	66,3±2,6
06Q263	83,8±2,6	64,7±3,1

* expresado como el porcentaje de protoplastos fluorescentes tras la tinción con FDA en la población recuperada de protoplastos.
Los resultados son la media de 3 repeticiones independientes ± SD.

Amplificación por PCR del ALS y secuenciación

ES 2 450 743 T3

Se aísla el ADN de resistentes microcolonias de tabaco al clorsulfurón utilizando el kit DNeasy (Qiagen) y se emplea como plantilla en una reacción de PCR. Las conversiones de los codones de actuación en el gen ALS del tabaco se detectan utilizando los cebadores 5'GGTCAAGTGCCACGTAGGAT

5 [SEC ID 4] y 5'GGGTGCTTCACTTTCTGCTC [SEC ID 5] que amplifican un fragmento de 776 pb de dicho gen, comprendiendo el codón 194. La conversión de nucleótidos en el callo del tabaco resistente a los herbicidas se confirma mediante la clonación de los productos de la PCR en pCR2.1::TOPO (Invitrogen) y la secuenciación de los plásmidos individuales. El tabaco contiene 2 alelos del ALS (SurA y SurB). La conversión de nucleótidos en el codón P194 de cualquiera de dichos locus es suficiente para proporcionar resistencia al clorsulfurón. Puesto que el tabaco es una especie alotetraploide, existen ocho posibles objetivos en el tabaco en los que se puede haber producido la TNE. En concordancia con ello, era necesario secuenciar > 10 clones de plásmidos que contuvieran el producto de la PCR para detectar uno con una conversión de CCA a CAA. Ello indica que en cada uno de callos resistentes a únicamente 1 de los 8 alelos ALS había experimentado a una conversión de nucleótidos mediante mutagénesis dirigida. En todos los callos producidos en dicho estudio, se observó la conversión esperada de los nucleótidos CCA a CAA.

15 LISTADO DE LA SECUENCIA

<110>KeygeneNV

20 <120> Intercambio de nucleótidos dirigido mejorado utilizando la introducción con polietilenglicol de oligonucleótidos monocatenarios en protoplastos vegetales

<130> P28853PC00

25 <160> 5

<170>PatentIn version 3.3

30 <210> 1
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

35 <220>
<223> oligonucleótido para intercambio de nucleótidos dirigido

<400> 1
tcagtaccta tcacacctacg ttgcacttga cctgttatag 40

40 <210> 2
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido para intercambio de nucleótidos dirigido

50 <400> 2
tcagtaccta tcacacctacg ttgcacttga cctgttatag 40

<210> 3
<211> 40
<212> ADN
55 <213> artificial

<220>
<223> oligonucleótido para intercambio de nucleótidos dirigido

60 <400> 3
atcgatcgat cgatcgatcg atcgatcgat cgatcgatcg 40

<210> 4
<211> 20
65 <212> ADN
<213> artificial

ES 2 450 743 T3

	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 4		
	ggtcaagtgc cacgtaggat	20	
	<210> 5		
10	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
15	<223> cebador		
	<400> 5		
	gggtgcttca ctttctgctc	20	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la alteración dirigida de una secuencia bicatenaria de ADN aceptor en un protoplasto de una célula vegetal, que comprende la combinación de la secuencia bicatenaria de ADN aceptor con una base nitrogenada mutágena dadora, comprendiendo la secuencia bicatenaria de ADN aceptor una primera secuencia de ADN y una segunda secuencia de ADN que es complementaria de la primera secuencia de ADN y comprendiendo la base nitrogenada mutágena dadora por lo menos un emparejamiento incorrecto con respecto a la secuencia bicatenaria de ADN aceptor a alterar, preferentemente con respecto a la primera secuencia de ADN, comprendiendo el procedimiento además una etapa de introducción de la base nitrogenada mutágena en los protoplastos celulares utilizando una transformación con polietilenglicol (PEG).
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la base nitrogenada mutágena monocatenaria presenta una longitud comprendida entre 10 y 60 nucleótidos.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la base nitrogenada mutágena monocatenaria comprende sustituciones de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) que son por lo menos un nucleótido eliminado del emparejamiento incorrecto dirigido y, opcionalmente, por lo menos 3, 4 o 5 nucleótidos eliminados de los extremos 5' y 3' de la base nitrogenada mutágena monocatenaria.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la base nitrogenada mutágena monocatenaria comprende sustituciones de propino.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN aceptor procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamíferos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos, ADN episómico.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para alterar una célula, corregir una mutación restaurando el tipo natural, introducir una mutación, inactivar un enzima disgregando la región de codificación, modificar la bioactividad de un enzima alterando la región de codificación o modificar una proteína disgregando la región de codificación.
- 35 7. Utilización de la transformación con PEG para aumentar la eficiencia de la mutagénesis dirigida utilizando una base nitrogenada mutágena monocatenaria en protoplastos vegetales en por lo menos 10 veces en comparación con la transformación basada en la electroporación.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que la base nitrogenada mutágena monocatenaria presenta una longitud comprendida entre 10 y 60.
- 45 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en la que la base nitrogenada mutágena monocatenaria comprende sustituciones de LNA que son por lo menos un nucleótido eliminado del emparejamiento incorrecto dirigido y, opcionalmente, por lo menos 3, 4 o 5 nucleótidos eliminados de los extremos 5' y 3' del oligonucleótido.
- 50 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la base nitrogenada mutágena monocatenaria comprende sustituciones de propino.
- 55 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN aceptor procede de ADN genómico, ADN lineal, cromosomas artificiales de mamíferos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras, cromosomas artificiales vegetales, ADN cromosómico nuclear, ADN cromosómico de orgánulos, ADN episómico.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para alterar una célula, corregir una mutación restaurando el tipo natural, introducir una mutación, inactivar un enzima disgregando la región de codificación, modificar la bioactividad de un enzima alterando la región de codificación o modificar una proteína disgregando la región de codificación.