

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 060**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010 E 14184365 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2813572**

54 Título: **Técnicas mejoradas para la transfección de protoplastos**

30 Prioridad:

**21.12.2009 US 288474 P**

**24.12.2009 NL 2004020**

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

**16.09.2016**

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)**

**P.O. Box 216**

**6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**BUNDOCK, PAUL;**

**LHUISSIER, FRANCK y**

**FIERENS-ONSTENK, BERNARDA GERHARDA**

**JOHANNA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 583 060 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**

Técnicas mejoradas para la transfección de protoplastos

5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos para la introducción de moléculas exógenas de interés en protoplastos de células vegetales.

10 Antecedentes de la invención

**[0002]** La modificación genética es el proceso de crear deliberadamente los cambios en el material genético de las células vivas con el fin de modificar una o más propiedades biológicas codificadas genéticamente de esa célula, o del organismo del que forma parte la célula o en el que se puede regenerar. Estos cambios pueden tomar la forma de eliminación de partes del material genético, la adición de material genético exógeno, o cambios, como sustituciones en la secuencia de nucleótidos existente del material genético.

**[0003]** Los procedimientos para la modificación genética de organismos eucariotas se conocen desde hace más de 20 años, y han encontrado una amplia aplicación en células vegetales y animales y microorganismos para mejoras en los campos de la agricultura, la salud humana, la calidad alimentaria y la protección del medio ambiente.

**[0004]** Los procedimientos comunes de modificación genética consisten en la adición de fragmentos de ADN exógeno al genoma de una célula, que a su vez conferirá una nueva propiedad a la célula o su organismo sobre o por encima de las propiedades codificadas por los genes ya existentes (incluyendo aplicaciones en las que la expresión de genes existentes quedará por tanto suprimida). Aunque muchos de estos ejemplos son eficaces en la obtención de las propiedades deseadas, estos procedimientos no son sin embargo muy precisos, porque no hay control sobre las posiciones genómicas en las que se insertan los fragmentos de ADN exógeno (y por tanto sobre los niveles últimos de expresión), y porque el efecto deseado tendrá que manifestarse sobre las propiedades naturales codificadas por el genoma original y bien equilibrado. Un problema común encontrado es que debido a la integración aleatoria de los fragmentos de ADN exógeno en el ADN genómico del huésped, los genes esenciales o beneficiosos son inactivados o modificados, causando la pérdida no deseada de las características deseables del huésped.

**[0005]** Por el contrario, los procedimientos de modificación genética que darán lugar a la adición, delección o conversión de nucleótidos en loci genómicos predefinidos permitirán la modificación precisa de genes existentes.

**[0006]** Con el aparición de la genómica en la última década, ahora es posible descifrar los genomas de animales, plantas y bacterias de forma rápida y rentable. Esto ha dado lugar a una gran cantidad de genes y secuencias reguladoras que pueden estar vinculados a fenotipos, tales como la susceptibilidad a enfermedades en animales o características de rendimiento de las plantas. Esto permitirá que la posible función de una secuencia se establezca rápidamente, pero la prueba definitiva de que un gen es responsable de un fenotipo observado debe obtenerse mediante la creación de una línea mutante que muestra el fenotipo alterado esperado.

**[0007]** A diferencia de los animales, las células vegetales están rodeados por una pared celular gruesa compuesta por una mezcla de polisacáridos y proteínas, y aunque las células animales son fácilmente susceptibles a la introducción de moléculas exógenas, las células vegetales son más recalcitrantes y requieren procedimientos algo más invasivos. Los procedimientos de la técnica anterior para introducir moléculas exógenas en una célula vegetal se pueden dividir en 2 categorías.

**[0008]** La primera categoría agrupa todos los procedimientos que hacen uso de introducción mecánica de la molécula de interés en la célula vegetal mediante punción de la pared celular vegetal. Esto puede lograrse mediante la administración biolística para la que la molécula de interés se recubre sobre partículas de metal, oro o tungsteno, que se empujan al interior de la célula utilizando un dispositivo de gas presurizado. La eficiencia de este enfoque es, sin embargo, más bien baja y puesto que no todas las células se transforman, se requiere la selección que restringe el número de dianas. Otro enfoque utiliza micro- o nanoagujas conectadas a un micromanipulador para inyectar el compuesto directamente en la célula vegetal a través de la pared celular. Sin embargo, la microinyección requiere un equipo especializado y una cantidad significativa de habilidad. El procedimiento también es tedioso y consume mucho tiempo y ofrece pocas ventajas con respecto a la administración biolística. Sin embargo, otro procedimiento usa nanotubos de carbono que contienen la molécula de interés y cuyas extremidades están recubiertas con enzimas que digieren la pared celular. Los nanotubos supuestamente degradarán localmente la pared celular y perforarán el plasmalema permitiendo la liberación de su contenido en la célula huésped. Aunque es menos invasiva que la microinyección o bombardeo biolístico, las limitaciones descritas anteriormente también se aplican aquí.

**[0009]** La segunda categoría agrupa todos los procedimientos en los que toda la pared celular vegetal se extrae enzimáticamente antes de la introducción de la molécula de interés. La extracción completa de la pared celular altera la conexión entre las células que producen una suspensión homogénea de células individualizadas que permiten experimentos de transfección más uniformes y a gran escala. Esto comprende, pero no se limita a, la fusión de

protoplastos, electroporación, transfección mediada por liposomas, y transfección mediada por polietilenglicol. Por lo tanto, la preparación de protoplastos es un procedimiento muy fiable y barato de producir millones de células y, a menudo, se prefiere sobre otros procedimientos por su flexibilidad, eficiencia y rendimiento.

- 5 **[0010]** Los protoplastos se pueden aislar de casi todos los tejidos de la planta. La principal fuente de protoplastos es el tejido mesófilo que produce grandes cantidades de protoplastos por gramo de peso fresco. El uso de otros tipos de tejido depende principalmente de la disponibilidad del procedimiento existente para el sistema considerado y el objetivo final del experimento.
- 10 **[0011]** Muchos procesos biológicos, si no todos, están regulados espacialmente y en el tiempo. Una célula tiene su propio reloj biológico del que el ciclo celular es la representación más evidente. Cada célula individual pasará por una serie de etapas de desarrollo, tales como el crecimiento (G0 G2), la replicación del ADN (S), división (M) y quiescencia (GO). Por tanto, es de relevancia tratar el estado del sistema en consideración cuando se diseñan experimentos para interactuar con las rutas específicas. La introducción de la molécula de interés tiene que estar programada cuidadosamente a fin de que coincida con el proceso estudiado. La molécula de interés tiene que ser estable en el entorno celular durante un largo período de tiempo hasta que pueda realizar su acción o tiene que administrarse poco antes de que el proceso bajo investigación comience. Por ejemplo, en los estudios de dinámica de microtúbulos durante la formación de bandas pre-profase mediante introducción de tubulina marcada en la célula, uno tiene que asegurarse de que la tubulina se libera poco antes de la formación de la banda pre-profase a menos que la tubulina marcada sea suficientemente estable para resistir la degradación enzimática hasta que se inicia la formación de la banda pre-profase. Para ese ejemplo particular, otra consideración sería la incorporación de la tubulina fluorescente en estructuras distintas de la banda pre-fase, de ahí la necesidad de liberar la sonda en el momento deseado.
- 25 **[0012]** Desafortunadamente, a excepción de los raros casos de cultivos de suspensión celular, las células del mesófilo de la que pueden derivarse los protoplastos se encuentran en un estado de quiescencia o reposo (GO) y sólo cuando los protoplastos se activan con un equilibrio hormonal adecuado vuelven a entrar en el ciclo celular y empiezan a fluir ("streaming") de forma activa. El tiempo necesario para que un protoplasto en reposo pase a través de una ronda de ciclo celular varía mucho de un sistema a otro y puede tardar desde unas pocas horas hasta varios días. Además, tan pronto como la mezcla de enzimas utilizada para generar los protoplastos se elimina por lavado, los protoplastos empezarán a formar de nuevo su pared celular, lo que reducirá o incluso impedirá completamente la introducción de moléculas exógenas si no se toman precauciones para retrasar o prevenir la formación de nuevo de la pared celular. Los protoplastos, por tanto, no pueden simplemente dejarse solos hasta que llegan a la etapa apropiada cuando la molécula de interés va a liberarse, la formación de nuevo de la pared celular debe evitarse de forma activa mientras que la capacidad de flujo de los protoplastos debe mantenerse.
- 30
- 35

Descripción resumida de la invención

- 40 **[0013]** Los presentes inventores han establecido para superar estos inconvenientes en la técnica y han ideado un procedimiento en el que los protoplastos y los ciclos celulares se pueden controlar y transfectar de manera más eficiente y de una manera más controlable.
- 45 **[0014]** Los presentes inventores han encontrado ahora que una combinación de dos etapas de transfección permite el control detallado de varios procesos biológicos en los protoplastos. La combinación de dos etapas de transfección se puede combinar con el uso de inhibidores de la pared celular, y/o una etapa de sincronización de la fase celular. Los inventores han encontrado que la introducción de diversas composiciones que en una primera etapa de transfección interactúan con ciertas rutas y/o introduce roturas de ADN de doble cadena y una segunda etapa en la que se realiza la transfección con la molécula exógena permite mejorar la eficiencia y control sobre los procesos de transfección. Los presentes inventores han encontrado, además, que mediante la adición de uno o más compuestos químicos no enzimáticos a los protoplastos, el compuesto o compuestos químicos interfieren con la formación de la pared celular, tal como mediante la inhibición de la celulosa sintasa, la deposición de celulosa o la captura de microfibrillas de celulosa nacientes, la sincronización y la eficiencia de la introducción de moléculas exógenas puede mejorar y optimizarse a través de la posibilidad de liberación de las moléculas exógenas más cerca en el tiempo a la fase deseada en el ciclo celular. Los presentes inventores también han encontrado que mediante la sincronización de las células en una cierta fase celular, se puede lograr un aumento de la transfección.
- 50
- 55 **[0015]** En términos más amplios, la supresión (transitoria) del sistema de reparación de desapareamientos y/o la ruta NHEJ y/o la introducción de roturas de ADN de doble cadena y (ii) la transfección del protoplasto con una molécula exógena de interés, tal como un oligonucleótido mutagénico, opcionalmente combinada con la inhibición transitoria de la formación de nuevo de la pared celular en los sistemas de protoplastos y/o la sincronización de la fase del ciclo celular es extremadamente valiosa cuando debe transfectarse un sistema de células en una etapa específica del ciclo celular cuando las células se vuelven competentes en ciertos procesos biológicos/bioquímicos que están distantes en el tiempo de del punto de aislamiento de los protoplastos. Además, la inhibición transitoria de la formación de nuevo de la pared celular en los sistemas de protoplastos permite la introducción secuencial de plásmidos expresados de forma transitoria, cuya acción combinada conduce al resultado deseado. Por ejemplo, la modificación dirigida de genes es más eficiente si la construcción ZFN se introduce cierto tiempo, por ejemplo, 4, 6,
- 60
- 65

12, 18 o 24 horas antes de introducir la construcción donante. Esto permite que ZFN se exprese e induzca las DSB necesarias para que tenga lugar la modificación dirigida de genes adecuada.

Descripción detallada

5 **[0016]** En un primer aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para la introducción de una o más moléculas de interés en un protoplasto de célula vegetal que comprende las etapas de  
 - proporcionar el protoplasto de célula vegetal mediante degradación enzimática y/o eliminación de la pared celular de una célula vegetal;  
 10 - realizar una primera transfección del protoplasto de célula vegetal con  
     i. una primera composición que es capaz de alterar la regulación de una o más rutas seleccionadas del grupo que consiste en sistema de reparación de desapareamientos, unión de extremos no homólogos; y/o  
     ii. una segunda composición que es capaz de inducir una rotura de ADN de doble cadena  
 - realizar una segunda transfección del protoplasto de célula vegetal con una o más moléculas de interés;  
 15 - permitir que se forme la pared celular;  
 en el que la segunda transfección se lleva a cabo después de la primera transfección.

**[0017]** Se entenderá por el experto en la materia que el término "y/o" implica en el contexto de la presente invención que se puede realizar una transfección con la primera composición o una transfección con la segunda composición, o una transfección con ambas. De esta manera, la primera transfección de acuerdo con la presente invención, y en todas las realizaciones, puede comprender una primera composición o una segunda composición o ambas.

**[0018]** En la primera etapa del procedimiento, se proporciona protoplastos de células vegetales. Los protoplastos se pueden proporcionar usando los procedimientos comunes (por ejemplo, utilizando macerasa) utilizados para la generación de protoplastos de células vegetales. Hasta la fecha se han descrito sistemas de protoplastos de células vegetales para el tomate (*Solanum Lycopersicon*), tabaco (*Nicotiana tabaccum*) y muchos más (*Brassica napus*, *Daucus carota*, *Lactuca sativa*, *Zea mays*, *Nicotiana benthamiana*, *Petunia hybrida*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*). La presente invención es aplicable en general a cualquier sistema de protoplastos, incluyendo aquellos, pero no limitados a, los indicados en el presente documento.

**[0019]** El protoplasto se puede derivar de células mesófilas (no se dividen activamente, de cultivos de meristemas (que se dividen activamente) y de suspensión celular (que se dividen activamente).

**[0020]** El protoplasto se puede transfectar con una primera composición que es capaz de alterar la regulación de una o más de las rutas seleccionadas del grupo que consiste en el sistema de reparación de desapareamientos, la ruta de unión de extremos no homólogos. Preferiblemente, la transfección es transitoria. Preferiblemente, el sistema de reparación de desapareamientos, la ruta de unión de extremos no homólogos están regulados por descenso.

**[0021]** La regulación de las rutas se consigue preferentemente mediante el uso de ARN de doble cadena que son capaces de regular estas rutas. Los ejemplos y directrices para la selección y el diseño de las composiciones adecuadas se proporcionan en el presente documento a continuación. En una realización, la primera composición es capaz de alterar la regulación de una o más de MutS, MutL, MutH, MSH2, MSH3, MSH6, MSH7, MLH1, MLH2, MLH3, PMS1, el complejo ADN-PK Ku70, Ku80, Ku86, Mre11, Rad50, RAD51, XRCC4, Nbs1.

Sistema de reparación de desapareamientos

**[0022]** Muchas lesiones son reparadas por el denominado sistema de reparación de desapareamientos (MMR). En *E. Coli*, el MMR consiste en 3 complejos principales, MutS, MutL y MutH. MutS está involucrado en el reconocimiento del desapareamiento y la señalización hacia el segundo complejo MutL que recluta MutH. MutH posee una actividad de formación de mellas que introducirá una mella en la cadena de ADN de nueva síntesis que contiene el desapareamiento. La presencia de una mella en la cadena de nueva síntesis señala a una exonucleasa el tramo de ADN que se degrada, incluyendo el nucleótido de desapareamiento. Una ADN polimerasa rellenará a continuación el hueco en la cadena hija. Los ortólogos de los genes MMR de *E. coli*, a excepción de MutH cuya función se lleva a cabo por MutL, se pueden encontrar en todos los eucariotas (para revisión, ver Kolodner y Marsishky 1999 *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9: 89-96). En las plantas, están presentes cuatro ortólogos de MutS (MSH2, MSH3, MSH6 y MSH7) y cuatro ortólogos de MutL (MLH1, MLH2, MLH3 y PMS1). El reconocimiento de los desapareamientos de desapareamientos de base-base o nucleótidos extrahelicoidales individuales se lleva a cabo por MutS $\alpha$  (un heterodímero MSH2::MSH6), mientras que los "loopout" extrahelicoidales más grandes son reconocidos por MutS $\beta$  (heterodímero MSH2::MSH3). El gen de MSH7 se ha identificado en plantas, pero no hasta el momento en animales. MSH7 es más similar a MSH6 y también forma un heterodímero (MutS $\gamma$ ) con MSH2 (Culligan y Hays, 2000, *Plant Cell* 12: 991-1002). La ruta MMR se ilustra en la figura 1, tomada de Li, 2008 *Cell Research* 18: 85-98.

**[0023]** Recientemente, se ha propuesto un procedimiento para la supresión transitoria de ARNm específico en protoplastos de plantas (An et al 2003 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2674-2677) y se ha encontrado ahora que es una herramienta valiosa para la supresión transitoria de genes de MMR (endógena) en plantas.

**[0024]** Las secuencias de genes asociados con la ruta de MMR (tales como MSH2, MSH3, MSH6, MSH7, MLH1, MLH2, MLH3 y PMS1) que se puede utilizar en las composiciones utilizadas para alterar la regulación de la ruta, tal como la generación del ARN de doble cadena, se encuentran en bases de datos públicas tales como GenBank entrada AF002706.1 para AtMSH2 y descrita aquí en otros puntos. Las secuencias específicas de la planta deseada se pueden identificar mediante el diseño de cebadores basados en, por ejemplo, secuencias de Arabidopsis disponibles, y posteriormente la identificación de los ortólogos deseados.

**[0025]** Las lesiones más tóxicas son las roturas de ADN de doble cadena (DSB). DSB puede resultar de la acción de agentes genotóxicos endógenos o exógenos, tales como especies reactivas de oxígeno, especialmente el radical hidroxilo, radiación ionizante o productos químicos (que incluyen agentes quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de cánceres). Los procesos celulares, tales como la reparación de otros tipos de lesiones del ADN, o la replicación del ADN, también dan lugar a DSB. Por ejemplo, la reparación del ADN mediante la reparación de la escisión de bases o nucleótidos implica endonucleasas, que introducen mellas de cadena simple. La co-incidencia de mellas de cadena simple o huecos en las dos cadenas de ADN conduce a la formación de un DSB. De manera similar, una mella de cadena simple o un hueco en dirección 5' de un tenedor de replicación se pueden procesar en un DSB mediante el desenrollado de la doble hélice del ADN (Bleuyard et al, 2006, DNA repair. 5: 1-12). Existen dos mecanismos competitivos (Figura 2, de Branzei y Foiani 2008 - 8 (9): 1038-46.) para reparar DSB, a saber, unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR). Las roturas de cadena doble (DSB) se reparan preferiblemente mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) durante la fase G1 y mediante recombinación homóloga (HR) durante las fases S y G2 del ciclo celular. La unión del heterodímero Ku a DSB desencadena el reclutamiento de la subunidad catalítica ADN-PK y el sellado de las DSB por NHEJ. Por el contrario, las DSB que se producen durante las fases S y G2 activan preferencialmente ATM a través del complejo MRE111-RAD50-NBS1. La mayor actividad de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) que es específica para las fases S y G2 del ciclo celular promueve la resección de DSB, exponiendo los salientes ("overhangs") 3' de ADN cadena simple (ssADN). Cuando el ssADN de salientes en 3' está recubierto con proteína de replicación A (RPA), activa ATR; puede eliminarse RPA y sustituirse por RAD51 con la ayuda de proteína mediadora, tal como RAD52. Esto conduce a la formación de filamentos presinápticos de RAD51, que inician HR invadiendo la región homóloga en la doble cadena para formar una unión de ADN llamada D-bucle, que puede extenderse aún más mediante la síntesis de ADN. El desplazamiento de la cadena de este intermedio por una ADN helicasa canaliza la reacción hacia la hibridación de cadenas dependiente de síntesis (SDSA). Alternativamente, el segundo extremo de DSB puede capturarse dando lugar a un intermedio doble de unión de Holliday que puede separarse por endonucleasa o se disuelve por la acción combinada de una helicasa (BLM) y una topoisomerasa (TOP3).

Ruta de unión de extremos no homólogos

**[0026]** NHEJ es el principal mecanismo de reparación de DSB e implica la reunificación de extremos romos o extremos con salientes cortos y comienza con el reconocimiento y la yuxtaposición de los extremos rotos. Esto es promovido por el complejo de ADN-PK que consiste en el heterodímero KU (Ku70 y Ku80 [o Ku86]) y la subunidad catalítica ADN-PK (ADN-PKcs). La maduración de los extremos de DSB se lleva a cabo por Artemis (Figura 3, de Goodarzi et al., 2006) y se vuelven a sellar por el complejo de Xrcc4/ADN ligasa IV. NHEJ es un proceso relativamente inexacto y con frecuencia está acompañado de inserción y delección de la secuencia de ADN (Bleuyard et al, 2006, Goodarzi et al, 2006 The EMBO Journal 25: 3.880-3.889). Se sabe que varios genes juegan un papel en la NHEJ, incluyendo KU70, KU80, y PARP-1.

**[0027]** Las secuencias de genes asociados con la ruta de NHEJ que se pueden utilizar en las composiciones utilizadas para alterar la regulación de la ruta, tal como la generación del dsARN, están disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank entrada AF283759.1 para AtKU70, y se describe en otros puntos del presente documento. Las secuencias específicas de la planta deseada se pueden identificar mediante el diseño de cebadores basados en, por ejemplo secuencias de Arabidopsis disponibles, y posteriormente la identificación de los ortólogos deseados.

Ruta de recombinación homóloga

**[0028]** HR es un proceso de reparación preciso que utiliza la cromátida hermana como molde y por lo tanto asegura la fidelidad de la reparación. La primera etapa hacia la reparación HR es la resección de las DSB para formar salientes 3' de cadena sencilla. El procesamiento de los extremos se lleva a cabo por el complejo MRN que consiste en las proteínas Mre11, Rad50 y NBS1. Con la ayuda de proteínas accesorias, Rad51 se recluta en los extremos de cadena sencilla y promueve la invasión del dobles cadenas homólogas (Figura 4 de Sugiyama et al., 2006 The EMBO journal, 1-10)

**[0029]** La cadena capturada se extiende a continuación mediante la síntesis de ADN y el segundo extremo de DSB es capturado dando lugar a la formación de un doble Holliday, que puede separarse por endonucleasas, lo que resulta en la formación de un cruce, o se disuelve por la acción combinada de una helicasa y una topoisomerasa (Bleuyard et al, 2006; Branzei y Foiani, 2008).

**[0030]** La primera transfección puede ser con una segunda composición que es capaz de inducir roturas de ADN de doble cadena. Ejemplos son las nucleasas de dedos de zinc y meganucleasas (Collectis, Francia), y nucleasas efectoras TAL (Bosch et al (2009) Science 326: 1509-1512; Moscou y otros (2009), Science Vol 326: 1501). Las nucleasas de dedos de zinc están diseñados de forma que se usa tecnología conocida en que inducen preferentemente la rotura de doble cadena en la posición deseada donde la segunda transfección, en ciertas realizaciones relacionadas con la mutagénesis dirigida, pretende introducir la mutación de los oligonucleótidos mutagénicos. Las nucleasas de dedos de zinc son proteínas diseñadas a medida para cortar en una cierta secuencia de ADN. Los dominios de dedos de zinc comprenden aproximadamente 30 aminoácidos que se pliegan en una estructura característica cuando se estabilizan por un ion zinc. Los dominios de dedos de zinc son capaces de unirse al ADN mediante la inserción en el surco mayor de la hélice de ADN. Cada dominio de dedos de zinc es capaz de unirse a un triplete de ADN específico (3 pbs) a través de residuos de aminoácidos clave en la región  $\alpha$ -hélice del dedo de zinc. Por lo tanto, cambiando estos aminoácidos clave, es posible alterar la especificidad de reconocimiento de un dedo de zinc para un cierto triplete y de ese modo crear una construcción de dedo de cinc, destinada deliberadamente a una secuencia de interés. La flexibilidad del sistema se deriva del hecho de que los dominios de dedos de cinc se pueden ligar entre sí en serie para unirse a secuencias largas de ADN. Por ejemplo, seis dominios de dedos de cinc en serie reconocen una secuencia de 18 pbs específica que es suficientemente larga para ser única en un genoma eucariota complejo. Una nucleasa de dedos de cinc (ZFN) se compone de una serie de dedos de zinc fusionados a la nucleasa FokI. La ZFN se introduce en la célula, y reconocerá y se unirá a una secuencia genómica específica. A medida que la nucleasa FokI corta como un dímero, se requiere una segunda ZFN que reconoce una secuencia específica en la cadena de ADN opuesta en el sitio de corte. A continuación, se realiza un corte de ADN, o rotura de doble cadena (DSB) entre las dos secuencias de ADN reconocidas (Miller et al, 2007 Nature Biotech 25 (7): 778-785; Cathomen y Joung 2008 Mol Ther 16 (7): 1200-1207; Foley et al, 2009 PLoS ONE 4 (2): e4348). En presencia de una secuencia homóloga, que puede ser la cromátida hermana o una construcción de ADN donante, la DSB puede repararse por HR. Esta es la base para el proceso de modificación dirigida de genes mediante el cual, en lugar de utilizar la cromátida hermana para la reparación, la información se copia de una construcción donante que se introduce en la célula. La construcción donante contiene alteraciones en comparación con el locus cromosómico original, y por lo tanto el proceso de HR incorpora estas alteraciones en el genoma.

**[0031]** La primera transfección puede comprender la transfección tanto con la primera como la segunda composición, de forma simultánea o secuencialmente (una después de la otra).

**[0032]** En el procedimiento de acuerdo con la invención, se lleva a cabo una segunda transfección para introducir dicha una o más moléculas de interés.

**[0033]** Las moléculas de interés se pueden seleccionar del grupo que consiste en productos químicos, ADN, ARN, proteínas, oligonucleótidos y péptidos. En ciertas realizaciones, la molécula de interés se selecciona de entre dsARN, miARN, siARN, plásmidos, oligonucleótidos mutagénicos, más preferiblemente oligonucleótidos mutagénicos.

**[0034]** En ciertas realizaciones, como la molécula de interés se puede utilizar el plásmido que codifica para una construcción de ZFN. La segunda etapa de transfección a continuación introduce una construcción de ZFN, que, tras la expresión, puede inducir las DSBs que se pueden utilizar en la huella genética.

**[0035]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos mutagénicos se pueden utilizar como la molécula de interés. El oligonucleótido mutagénico, una vez transfectado en el protoplasto es capaz de proporcionar una alteración en el ADN del protoplasto. Preferiblemente, el ADN diana para el oligonucleótido mutagénico es de ADN nuclear. Alternativamente, se puede utilizar cloroplasto o ADN mitocondrial. En principio, se puede utilizar cualquier oligonucleótido mutagénico descrito hasta ahora en la técnica, tal como oligonucleótidos químicos de ARN/ADN, oligonucleótidos que incluyen los que contienen LNA, fosforotioatos, sustituciones de propino, etc.

**[0036]** El uso de un oligonucleótido mutagénico como la molécula de interés proporciona de este modo un intercambio de nucleótidos seleccionados mediado por oligonucleótido (ODTNE).

**55** Intercambio de nucleótidos seleccionados mediado por oligonucleótido (ODTNE)

**[0037]** El intercambio de nucleótidos seleccionados mediado por oligonucleótido (ODTNE) se refiere al uso de oligonucleótidos de cadena simple para corregir o alterar loci genómico mediante la introducción de mutación o mutaciones, tales como mutaciones puntuales o deleciones/inserciones, reataurando, por lo tanto, la función del gen original. Este concepto es la base de la terapia génica y la medicina personalizada y se ha estudiado ampliamente en todo el mundo (Parekh-Olmedo et al, 2002, Neuron 33: 495-498; Madsen et al, 2008 PNAS 105: 10, 3909-3914; Leclerc et al, 2009 9:35 BMC Biotechnology, 1-16). Se han identificado varios parámetros que influyen en la eficacia y eficiencia de ODTNE y aunque algunos todavía requieren validación, está bien establecido ahora que un sistema funcional MMR contrarresta ODTNE (Igoucheva et al, 2008 Oligonucleotides 18: 111-122; Kennedy Maguire y Kmiec, 2007 Gene 386: 107-114; Papaioannou y otros, 2009 J. Gene Med. 11: 267-274). El uso de ODTNE y la estructura y el diseño de los oligonucleótidos que son funcionales en esta tecnología están bien descritos, entre

5 otras en los documento WO98/54330, WO99/25853, WO01/24615, WO01/25460, WO2007/084294, WO2007073149, WO2007073166, WO2007073170, WO2009002150. Basándose en las características estructurales de los oligonucleótidos mutagénicos descritos en este documento y la información de secuencia de la secuencia diana (gen a alterar) el experto puede diseñar el oligonucleótido mutagénico deseado para ser utilizado en la segunda etapa de transfección. Los oligonucleótidos mutagénicos utilizados en la presente invención tienen una longitud que está en línea con otros oligonucleótidos mutagénicos utilizados en la técnica, es decir, típicamente entre 10-60 nucleótidos, preferiblemente 20 a 55 nucleótidos, más preferiblemente 25-50 nucleótidos.

10 **[0038]** La presente invención que utiliza un oligonucleótido mutagénico se puede utilizar por ejemplo para alterar una célula, corregir una mutación mediante la restauración al tipo salvaje, inducir una mutación, inactivar una enzima mediante la alteración de la región de codificación, modificar la bioactividad de una enzima mediante la alteración de la región de codificación, modificar una proteína mediante la alteración de la región de codificación, modificar los las dianas de miARN, modificar genes precursores y muchos más objetivos.

15 **[0039]** En ciertas realizaciones, la molécula de interés es una construcción de ADN. Una construcción de ADN es una secuencia de ADN que contiene la información de la secuencia de la cual se desea que se introduzca en la célula (modificación dirigida de genes). La construcción de ADN puede ser una construcción de ZFN.

20 **[0040]** La transfección, tanto la primera como la segunda transfección, se puede lograr utilizando los procedimientos descritos en la técnica, tales como electroporación, biolística, transfección mediada por PEG etc. Hay una preferencia para la transfección mediada por PEG. La transfección convencional, tal como la transfección mediada por PEG (preferida) o biolística, puede llevarse a cabo utilizando los procedimientos del estado de la técnica (Sporlein et al (1991) Theor Appl Genet 82, 712-722; Mathur y Koncz. Methods in Molecular Biology. Vol 82: Arabidopsis Protocols J. Marinez-Zapater y J. Salinas Eds Humana Press Inc. Totowa NJ; Golds et al (1993) Bio/Technology 11, 95-100).

30 **[0041]** La reconstrucción génica es una técnica extremadamente potente que tiene muchas aplicaciones en la medicina y la agricultura. Se permite la manipulación precisa del genoma, lo que permite a los biólogos estudiar y explotar la función de los genes. Sin embargo, la eficiencia de HR en casi todos los tipos de células es baja ya que se basa en la presencia de un DSB en el locus cromosómico. La utilidad de ZFN es, por lo tanto, su capacidad para inducir una DSB en cualquier locus cromosómico, y se han utilizado para mejorar la eficacia dla modificación dirigida de genes 100 veces. Una vez que se produce una DSB, puede repararse por cualquiera de las rutas NHEJ o HR. La eficiencia de HR, y por lo tanto la modificación dirigida de genes, puede mejorarse mediante la inhibición de la ruta de NHEJ de modo que las DSB pueden repararse por HR. Esto se ha demostrado que es de hecho el caso en las células humanas y fúngicas (Fattah et al 2008 Proc. 105: 8703-8708; Meyer et al 2007 J. Biotechnology 128: 770-775; Bertolini y otros, 2009 Mol. Biotechnol. 41: 106-114). La elección entre NHEJ y HR también puede depender de las fases del ciclo celular, en G1, NHEJ predomina debido a la ausencia de la plantilla homóloga, mientras que HR es más activo en G2/M, donde una cromátida hermana homóloga está presente (Branzei y Foiani, 2008, Nature Reviews molecular biology).

40 **ODTNE y ZFN en el cultivo de plantas**

45 **[0042]** El cultivo de plantas utiliza la variación genética natural para mejorar el rendimiento de las plantas por cruzamiento convencional. Sin embargo, la variación natural es limitada y son necesarios muchos años para un programa de cultivo para producir una nueva variedad valiosa. La variación genética puede crearse artificialmente y tradicionalmente, esto se hace por mutagénesis química que introduce muchas mutaciones en el genoma de la planta huésped. Algunas mutaciones finalmente darán el fenotipo de interés y se pueden utilizar en un programa de cultivo. Estos procedimientos sin embargo tienen deficiencias, tales como la necesidad de muchos retrocruzamientos para eliminar mutaciones residuales y el alcance limitado de mutaciones introducidas por este tipo de productos químicos. Las tecnologías, taes como ODTNE y ZFN, por lo tanto, representan soluciones atractivas para introducir variación genética de una manera dirigida y limpia en las plantas. Sin embargo, el traslado de un sistema animal a un sistema vegetal representa todo un reto, especialmente para replicar las condiciones fisiológicas conocidas para promover la alteración génica dirigida.

55 **[0043]** Un sistema MMR funcional contrarresta ODTNE y se ha observado un aumento sustancial en la reparación de genes después de eliminar MSH2 utilizando siARN. Los procedimientos sin embargo usan una construcción de siARN integrada de forma estable y, por tanto, MSH2 se suprime de forma constitutiva que no es favorable, ya que, a largo plazo, el fenotipo mutador resultante dará lugar a la muerte de la planta. También se ha demostrado que ODTNE es promovido en células que se acumulan en la fase S del ciclo celular.

60 **[0044]** Se ha descrito un procedimiento para la supresión transitoria de ARNm específico en protoplastos de plantas (An et al 2003 Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 2674-2677) y se ha encontrado ahora que puede ser una herramienta valiosa para la supresión transitoria de genes MMR (endógenos) en las plantas. La acumulación de células en fase S se puede lograr fácilmente mediante sustancias químicas, tales como la hidroxíurea o afidicolina. Los inventores han encontrado que la coordinación de estos diversos parámetros con la administración del oligonucleótido puede potenciar el efecto de cada parámetro individual. Para lograr esto, la presente invención

proporciona la supresión de MMR, mientras las células se acumulan en la fase S del ciclo celular, seguido de la introducción del oligonucleótido para impulsar la corrección del gen de interés.

5 [0045] Lo mismo es válido para la modificación dirigida de genes, donde antes de introducir la construcción donante, es deseable una mayor proporción de células en las fases S/G2/M del ciclo celular, se suprime NHEJ, se expresan ZFN y se generan DSB.

10 [0046] En las células vegetales, la introducción de moléculas exógenas en la célula no es tan sencillo como en células animales debido a la presencia de una célula muy gruesa que necesita extraerse para que la molécula de interés alcance el protoplasto. Esto se consigue por digestión enzimática de la pared celular con enzimas celulolíticas y pectolíticas, pero tan pronto como la mezcla de enzimas se elimina por lavado, la célula comenzará a volver a formar la pared celular. Por tanto, es crítico evitar que se vuelva a formar la pared celular, si se quiere conservar la transformabilidad del protoplasto durante largos períodos de tiempo, por ejemplo durante por lo menos 15 10, 30, 60 minutos, o 1, 2, 4, 6,8, 10, 12, 16 ó 24 horas, o más; por ejemplo de 10 minutos a 24 horas. Convenientemente, existen productos químicos que afectan a la síntesis de la pared celular y se pueden utilizar para mantener el protoplasto desnudo hasta ser transfectado con las diferentes moléculas de interés. En la presente solicitud, se aportan pruebas de que el uso de tales inhibidores de la pared celular permite la introducción secuencial de moléculas exógenas en protoplastos de plantas que conduce a una mayor eficiencia de la alteración del gen diana mediada por oligonucleótidos y la modificación dirigida de genes usando ZFN.

20 [0047] Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, para evitar que la formación de nuevo de la pared celular, se añade una composición no enzimática al cultivo de protoplastos. Al alterar, prevenir, reducir y/o retrasar la formación de nuevo de la pared celular hasta que las células alcanzan una etapa apropiada en el ciclo celular; más moléculas exógenas se pueden liberar a la célula, y se puede conseguir un aumento en la eficiencia de la transfección. La eliminación de la composición no enzimática, por ejemplo por lavado o reemplazando el medio por 25 un medio que no contiene el compuesto que inhibe la formación de nuevo de la pared celular permite que se forme la pared celular y que continúe el ciclo celular.

30 [0048] La composición no enzimática puede añadirse al protoplasto de células vegetales en función de las circunstancias particulares de las transfecciones deseadas. La composición se puede añadir  
 - antes o simultáneamente con la primera transfección;  
 - entre la primera y segunda transfección,  
 - antes o simultáneamente con la segunda transfección, o  
 35 después de la segunda transfección.

[0049] La composición no enzimática que inhibe o impide la formación de la pared celular se puede extraer:  
 - antes o simultáneamente con la primera transfección,  
 - entre la primera y segunda transfección,  
 - antes o simultáneamente con la segunda transfección, o  
 40 después de la segunda transfección y antes de permitir que se forme la pared celular.

[0050] De esta manera, la formación de nuevo de la pared celular puede ser inhibida teniendo en cuenta la transfección deseada. Por ejemplo, para la formación huella genética en el locus ALS de tomate como se ilustra en la Figura 5, la composición se añade antes de la primera etapa de transfección. En otros ejemplos (ver Figura 6 y 45 Figura 7), la composición se añade (casi) simultáneamente con la primera transfección. Asimismo, es posible permitir que la formación de nuevo de la pared celular durante un breve período de tiempo (1-24 horas) y a continuación detener la formación de la pared celular antes de la primera transfección.

50 [0051] Los períodos de tiempo entre la primera transfección y la segunda transfección pueden variar de al menos 10, 30, 60 minutos, o 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 horas, hasta varios días, por ejemplo, hasta 96 horas, o incluso más. Normalmente, el período es de 1 hora a 72 horas, preferiblemente de 2 a 48 horas, más preferiblemente de 4 a 42 horas, incluso más preferiblemente entre 12 y 36 horas.

55 [0052] La interferencia con la formación (de nuevo) de la pared celular (a través de la inhibición, alteración, retraso y/o reducción) se consigue mediante la adición de uno o más compuestos químicos (es decir, no enzimáticos) al medio de cultivo de protoplastos que, por ejemplo, inhiben la deposición de celulosa o capturan microfibrillas de celulosa naciendo evitando de este modo su incorporación en una pared celular organizada (Parekh-Olmedo et al (2003) Ann NY Acad Sci 1002, 43-56; Anderson et al (2002) J. Plant Physiol 159, 61-67.; Meyer y Herth (1978) 60 Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesos, but not of nuclear división, in protoplasts of Nicotiana tabacum L. cultivated in vitro Plant 142 (3), 253-262).

[0053] Los compuestos químicos que se utilizan en la presente invención se refieren en esta solicitud como "inhibidores de la formación de la pared celular". Estos compuestos químicos son capaces de prevenir, alterar, inhibir y/o retrasar la formación de la pared celular de celulosa, indicado en el presente documento como "inhibición con la 65 formación de la pared celular".

[0054] El cultivo de protoplastos se puede permitir que siga a través de su ciclo de desarrollo normal, sólo en ausencia de, o al menos con una reducción en, la formación de la pared celular. A medida que el protoplasto ha pasado a través de su ciclo de desarrollo y ha llegado a la fase en la que se desea que comience la síntesis de ADN, el inhibidor de la formación de la pared celular puede eliminarse sustancialmente del cultivo de protoplastos, por ejemplo mediante lavado o mediante la sustitución del medio de cultivo.

[0055] Por lo tanto, el tratamiento de protoplastos con los inhibidores de la formación de la pared celular prohíbe la formación de la pared celular durante, por ejemplo, al menos 12-60 horas, o 24-48 horas, desde el momento en que se añade el inhibidor o inhibidores. Por lo tanto, la inhibición de la formación de la pared celular durante un tiempo suficiente permite el uso de tecnologías convencionales de transfección en un momento en el que el ciclo celular en la célula no es normalmente receptivo para la transfección. El uso del inhibidor típicamente no influye en la progresión del ciclo celular.

[0056] El producto químico en cuestión debe impedir preferiblemente la formación de nuevo de la pared celular sin interferir significativamente con la progresión del ciclo celular o ser perjudicial para los protoplastos a la concentración utilizada. En este contexto, "sin interferir significativamente" significa que el producto químico permite que continúe la progresión del ciclo celular al menos el 50%, al menos 75%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 95% de su tasa normal, es decir, en ausencia de la sustancia química. En este contexto "ser perjudicial" significa que al menos el 50%, al menos 75%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 95% de los protoplastos no se ven afectadas por el producto químico en otra forma que la inhibición de la formación de nuevo de la pared celular tal como se describe en este documento.

[0057] Varios productos químicos interfieren con la formación de la pared celular. Muchos de estos productos químicos se usan habitualmente como herbicidas. Por ejemplo, 2,6-diclorobenzonitrilo (DCB) (DeBolt et al (2007) Plant Physiology 145, 334-338; Anderson et al (2002) J. Plant Physiol 159, 61-67) es un herbicida bien conocido que actúa inhibiendo las celulasas, alterando por tanto la formación de la placa celular (Vaughn et al (1996) Protoplasma 194, 117-132). Se ha demostrado que el DCB inhibe la motilidad de los complejos de celulasas sintasa sin afectar a su liberación a la membrana plasmática (DeBolt et al (2007) Plant Physiology 145, 334-338). Además, los inhibidores de la formación de la pared celular preferidos no afectan a la progresión del ciclo celular (Galbraith y Shields (1982) The effect of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. Physiologia Plantarum 55 (1), 25-30; Meyer y Herth (1978) Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis, but not of nuclear division, in protoplasts of Nicotiana tabacum L. cultivated in vitro. Plant 142 (3), 253-262), o sólo hasta cierto grado, ya que la progresión del ciclo celular es naturalmente de gran importancia con respecto a la tecnología actual. DCB no limita la progresión del ciclo celular y, como tal, es un inhibidor de la formación de la pared celular preferido.

[0058] Otros productos químicos incluyen el herbicida isoxaben (DeBolt et al (2007) Plant Physiology 145, 334-338), que inhibe la integración de los complejos de celulasas sintasa en la membrana plasmática y altera las existentes. Por lo tanto, en una realización preferida, el inhibidor de la síntesis de celulosa es un inhibidor de la celulasas sintasa. En otra realización, la sustancia química interfiere con los genes responsables de la síntesis de celulosa, tales como los genes de CESA. El calcofluor blanco, también llamado abrillantador fluorescente, compite con las microfibrillas de celulosa evitando su integración en una red coordinada (Roncero y Durán (1985) Journal of Bacteriology 163 (3), 1180-1185, Haigler et al (1980), Science 210 (4472), 903-906).

[0059] Otros inhibidores de la formación de la pared celular son, por ejemplo, los inhibidores de la biosíntesis de celulosa, tales como herbicidas de nitrilo, benzamida y/o triazolocarboxamidas, inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, tales como herbicidas de dinitroanilina, fosforoamidato, piridina, benzamida y/o ácido benzenodicarboxílicos y/o inhibidores de la deposición de celulosa.

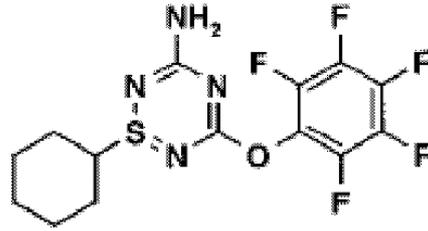
[0060] En ciertas realizaciones, el inhibidor de la biosíntesis de celulosa se selecciona del grupo que consiste en diclobenilo, clortiamida, flupoxam, triazofenamida, ftiazolina A, Ftoramida, taxtomina A, brefeldina A.

[0061] En ciertas realizaciones, el inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos se selecciona del grupo que consiste en cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam DCPA (clortal-dimetilo).

[0062] En ciertas realizaciones, el inhibidor de la deposición de celulosa es quinclorac.

[0063] En ciertas realizaciones, el inhibidor de la formación de la pared celular se selecciona del grupo que consiste en morlin (7-etoxi-4-metil cromen-2-ona), isoxaben (CAS 82558-50-7, N-[3-(1-etil-1-metilpropil)-1,2-oxazol-5-il]-2,6-dimetoxibenzamida), AE F150944 (N2-(1-etil-3-fenilpropil)-6-(1-fluoro-1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina), diclobenilo

[0064] (diclorobenzonitrilo), calcofluor y/o calcofluor blanco (4,4'-bis ((4-anilino-6-bis (2-hidroxietil) amino-s-triazin-2-il) amino)-, ácido 2,2'-estilbenodisulfónico y sales del mismo), orizalina (CASRN - 19044-88-3, 4- (dipropilamino)-3,5-dinitrobenzenosulfonamida), 5-terc-butil-carbamoiloxi-3-(3-trifluorometil)fenil-4-tiazolidinona, cumarina, 3,4-deshidroprolina,



cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam, DCPA (clortal-dimetilo), quinclorac.

20 **[0065]** En ciertas realizaciones, se pueden usar mezclas de dos o más de los productos químicos mencionados anteriormente. Estos se pueden agregar a la muestra de protoplastos simultáneamente o sucesivamente.

25 **[0066]** La cantidad y la concentración de la composición no enzimática diferirán entre los diversos (mezclas de) productos químicos y sistemas de protoplastos, pero puede determinarse fácilmente por el experto en la materia, en base a la literatura disponible citada en este documento, junto con un poco de experimentación básica inicial.

30 **[0067]** La célula vegetal puede ser una dicotiledónea o una monocotiledónea.

**[0068]** Las dicotiledóneas preferidas a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en Magnoliaceae, Ranunculaceae, Cactaceae, Asteraceae, Fagaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Lamiaceae, Rosaceae, Oleaceae, Cucurbitaceae, y Umbelifereae.

**[0069]** Las monocotiledóneas preferidas a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en Poaceae, Orchidaceae, Iridaceae, Lemnaceae, Liliaceae, y Alliaceae.

35 **[0070]** Los cultivos preferidos son patata, maíz, tomate, tabaco, algodón, soja, semilla de colza.

40 **[0071]** Los protoplastos recién aislados normalmente se sincronizan de forma natural en G0 (Galbraith y Shields (1982). *Physiologia Plantarum* 55 (1), 25-30). Dependiendo de la transfección deseada y de la fase celular deseada (la fase S, la fase M, la fase G1 y/o G2), la necesidad de sincronización adicional de los protoplastos puede ser ventajosa en ciertas realizaciones para mejorar aún más la eficiencia del proceso global o de la etapa de transfección. Diferentes protoplastos, tales como los derivados de mesófilo, meristemo, o suspensión de células, pueden o no dividirse activamente y la sincronización de la fase celular puede ser deseable para lograr la transfección adecuada.

45 **[0072]** Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además una etapa de sincronización de la fase celular de la célula vegetal o el protoplasto de la célula vegetal.

50 **[0073]** La sincronización de la fase celular se puede lograr mediante la privación de nutrientes, tales como privación de fosfato, privación de nitrato, privación de iones, privación de suero, privación de sacarosa, privación de auxina. La sincronización también se puede lograr mediante la adición de un agente de sincronización a la muestra de protoplastos.

**[0074]** La sincronización puede tener lugar:

- 55
- antes de que el protoplasto de la célula vegetal se forme a partir de la célula vegetal; o
  - antes de la primera transfección; o
  - antes de la segunda transfección; o
  - entre la primera y la segunda transfección.

60 **[0075]** La etapa de sincronización puede contener también una etapa en la que se elimina el agente de sincronización, por ejemplo por lavado o sustitución del medio.

- 65
- antes de que el protoplasto de la célula vegetal se forme a partir de la célula vegetal; o
  - antes de la primera transfección; o
  - antes de la segunda transfección; o
  - entre la primera y la segunda transfección; o
  - después o simultáneamente con la segunda transfección.

[0076] La etapa de sincronización se puede realizar de forma independiente (por ejemplo, antes, después o simultáneamente con) la etapa de poner en contacto el protoplasto de la célula vegetal con una composición no enzimática que inhibe o previene la formación (de nuevo) de la pared celular.

5 [0077] Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede añadir un agente de sincronización a la muestra de protoplasto. Los agentes de sincronización tales como afidicolina (preferido), hidroxiurea (preferido), timidina, colchicina, cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam DCPA (clortal-dimetilo), mimosina, anisomicina, amanitina, lovastatina, ácido jasmónico, ácido abscísico, menadiona, criptogeina, calor, peróxido de hidrógeno, permanganato de sodio, indometacina, epoxomicina, lactacisteína, ICRF  
10 193, olomoucina, roscovitina, bohemina, estaurosporina, K252a, ácido ocadaico, endotal, cafeína, MG132, quinasas dependientes de ciclina e inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, así como su mecanismo diana, las cantidades y concentraciones y sus fases del ciclo celular asociadas se describen por ejemplo en "Flow Cytometry with plant cells", J. Dolezel c.s. Eds. Wiley-VCH Verlag 2007 pág 327. Existe una preferencia por afidicolina y/o  
15 hidroxiurea.

[0078] En realizaciones preferidas del procedimiento de la presente invención, dirigidas a la formación de la huella genética en un locus seleccionado, el procedimiento comprende las etapas de digestión de la pared celular para generar protoplastos, inhibición de la pared celular por una composición que comprende un inhibidor de la formación de la pared celular (preferiblemente DCB), adición de un agente de sincronización (preferiblemente hidroxiurea) (al mismo tiempo o antes de la primera transfección), la adición de un dsARN contra KU70 (primera composición), adición (preferiblemente después de un período de, por ejemplo, aproximadamente 6, 12, 18 o 24 horas) de una construcción de ZFN (segunda composición o segunda de transfección), eliminación del agente de sincronización simultáneamente con o justo antes de la segunda transfección).

25 [0079] En realizaciones preferidas, destinadas a eventos de modificación dirigida de genes, el procedimiento según la invención comprende la formación de protoplastos de células vegetales, adición de inhibidor de la formación de la pared celular, adición de agente de sincronización, construcción de ZFN y/o dsARN contra, por ejemplo, pero no restringido a, KU70 (NHEJ) (primera transfección) y después de un período de sincronización de, por ejemplo, 6, 12, 30 18 o 24 horas, una segunda transfección de una construcción donante con eliminación del agente de sincronización.

[0080] En realizaciones preferidas dirigidas a ODTNE en protoplastos, las células vegetales se proporcionan con un agente de sincronización hasta 48 horas antes de la formación del protoplasto. Después de la digestión de la pared celular, se añade el inhibidor de la pared celular junto con dsARN contra MMR (MSH2 u otros genes relacionados con MMR) (primera transfección). En la fase del ciclo celular deseada, se levanta la inhibición de la pared celular, se elimina el agente de sincronización, se añade el oligonucleótido mutagénico para la segunda transfección y se deja que la célula continúe el ciclo celular.

40 [0081] La descripción también se refiere a kits para transfectar protoplastos de células vegetales que comprenden dos o más seleccionados del grupo que consiste en una primera composición, una segunda composición, una composición no enzimática que inhibe o evita la formación de la pared celular, un agente de sincronización y una o más moléculas de interés exógenas

#### Breve descripción de las figuras

45 [0082]  
Figura 1: Una representación esquemática para la señalización aguas abajo del MMR después del reconocimiento de desapareamientos.  
Figura 2: Una representación esquemática para NHEJ y HR, tomada de Branzei y Foiani, 2008 - 8 (9): 1038-1046.  
50 Figura 3: Una representación esquemática de la maduración de extremos DSB.  
Figura 4: Una representación esquemática de recombinación homóloga.  
Figura 5: Diseño experimental para la formación de huellas genéticas en protoplastos vegetales.  
Figura 6: Diseño experimental para eventos de modificación dirigida de genes.  
Figura 7: Diseño experimental para la restauración de meGFP en protoplastos BY-2  
55 Figura 8: Niveles de MSH2 en protoplastos de tabaco y tomate tras la adición de dsARN

#### Ejemplos:

##### Genes de la reparación de desapareamientos en plantas y genes de la unión de extremos no homólogos

60 [0083] Se cribaron bases de datos públicas para la homología compartida de EST de tabaco y tomate con genes implicados en la ruta MMR (MSH2) y la ruta NHEJ (Ku70). Las regiones usadas para producir dsARN están subrayadas. dsARN se produjo de acuerdo con protocolos bien conocidos en la técnica. Además, se generó una especie de dsARN no específica derivada de un plásmido que no muestra homología significativa con ninguno de los genes de interés. Esto se utilizó como control para demostrar que la presencia de dsARN *per se* no es responsable de la supresión de la ARNm específicos.  
65

**Ku70 de tomate**

[0084]

5  
 10  
 15  
 20  
 25

GGAAGATCTGAACGACCAGCTTAGGAAACGCATGTTTAAGAAGCGCAGAGTTCGAAGACT  
 TCGACTTGTAATTTTTAATGGATTATCTATCGAACTTAACACCTATGCTTTGATCCGTCCAACCTAATC  
 CAGGGACAATTACTTGGCTTGATTTCGATGACTAATCTTCCTTTGAAGACTGAGAGAACCCTTCATAT  
 GTGCTGATACTGGTGCTATAGTTCAGGAGCCTCTAAAACGCTTTCAGTCTTACAAAAATGAGAATG  
 TCATCTTTTCTGCGGATGAGCTTTCAGAAGTCAAAGAGTTTCAACTGGACATCTTCGTCTGTTGG  
 GCTTCAAGCCTTTGAGCTGCTTAAAAGACTATCATAACCTGAAGCCAGCAACTTTTGTCTTTCCCA  
 GTGATGAGGAAGTGGTTGGAAGCACTTGTCTTTTCGTTGCTCTCCAAAGATCAATGTTGCGGCTTA  
 AGCGTTTTGCAGTTGCTTCTATGGGAATTTAAGTCATCCTCAATTGGTTGCTCTTGTGACACAAGA  
 TGAAGTAATGACTCCTAGTGGTCAAGTCGAGCCACCAGGGATGCATCTGATTTATCTTCCATATTC  
 TGATGATATCAGACATGTTGAAGAGCTTCATACTGATCCTAATTCCGTGCCTCATGCCACTGATGA  
 CCAGATAAAGAAGGCCTCCGCTTTAGTGAGACGTATTGACCTCAAAGATTTTTCTGTGTGGCAATT  
 TGCTAATCCTGCATTGCAGAGACATTATGCAGTATTACAAGCTCTTGCACTTG [SEQ ID NO 1]

**MSH2 de tabaco**

[0085]

30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

GGAGCTACTGATAGATCATTGATTATAATTGATGAGTTGGGCCGTGGTACATCAACCTATG  
 ATGGCTTTGGTTTAGCTTGGGCTATTTGTGAGCACATTGTTGAAGAAATTAAGGCACCAACATTGT  
 TTGCCACTCACTTTCATGAGCTGACTGCATTGGCCAACAAGAATGGTAACAATGGACATAAGCAAAA  
 ATGCTGGGATAGCAAATTTTCATGTTTTTGCACACATTGACCCTTCTAATCGCAAGCTAACTATGCT  
 TTACAAGGTTCAACCAGGTGCTTGTGATCAGAGTTTTGGTATTCATGTTGCTGAATTTGCAAATTTT  
 CCACCGAGTGTGTGGCCCTGGCCAGAGAAAAGGCATCTGAGTTGGAGGATTTCTCTCCTATTGC  
 CATAATTCCAAATGACATTAAGAGGGCAGCTTCAAACCGGAAGAGAGAATTTGACCCTCATGACGT  
 GTCTAGAGGTACTGCCAGAGCTCGGCAATTCTTACAGGATTTCTCTCAGTTGCCACTGGATAAGAT  
 GGATCCAAGCGAGGTGAGGCAACAGTTGAGCAAATGAAAACCGACCTGGAGAGGGATGCAGTT  
 GACTCTCACTGGTTTCAGCAATTCCTTTAGTTCTTACAGATTAGAACTATATCTTCTATTCTGTGAAG  
 CTTGGGGGAATGATAGTGATGGGTTTTGTGGATATAACTTAGCCTAAGTGTAAGTTTCGTTTAAA  
 TCCTTACCCCAAACATGATTCTCTGTAATCAGGGGACTTTTGTATGCATCCTGTGTTAAATAGTAAA  
 CGTTATCTTATGGTCAGCTAACATTGGTAGTAGTCTATTGAATTATTCCTTACAACGACTAAACAA  
 CCTTCCCTTCTCTTAAAACACCCTAAACT [SEQ ID NO 2]

**Evaluación de regulación por descenso de NtMSH2 y LeKu70**

60

[0086] Veinticuatro horas después de la transfección de protoplastos con dsARN contra LeKu70 o agua MilliQ, se aisló el ARN total utilizando el Kit RNAeasy (Qiagen). La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit Quantitect RT (Qiagen). Se midieron los niveles de LeKu70 endógeno usando un aparato Light Cycler (Roche). Los cebadores utilizados para la cuantificación del mRNA se indican a continuación.

Gen	Cebador directo	SEQ ID NO	Cebador inverso	SEQ ID NO
Ku70 de tomate	ACCAGCTTAGGAAACGCA	3	AGCACCAGTATCAGCACA	4
MSH2 de	CACACATTGACCCTTCTAATCGC	5	AGAAATCCTCCAACCTCAGATGCC	6

tabaco				
--------	--	--	--	--

### Aislamiento de protoplastos de tomate

5 [0087] Se mantienen cultivos de brotes in vitro de la variedad de cultivo M82 de tomate en medio MS20 suplementado con Micro-agar al 0,8% con un fotoperíodo 16/8 h de 2000 lux a 25°C y 60-70% de humedad relativa. Se corta suavemente un gramo de hojas jóvenes en CPW9M y se transfiere a la solución de enzima (CPW9M que contiene celulosa de Onozuka RS al 2%, macerozima de Onozuka R10 al 0,4%, 2,4-D (2 mg/ml), NAA (2 mg/ml), BAP (2 mg/ml) pH 5,8), e hidroxurea (2 mM)). Se deja que proceda la digestión durante la noche a 25°C en la oscuridad. A la mañana siguiente, se agitan suavemente placas de Petri durante una hora para liberar protoplastos.

10 La suspensión de protoplastos se filtra a través de un tamiz de acero inoxidable de malla de 50 µm y los protoplastos se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente durante 5 min. a 85xg. El sedimento de protoplastos se resuspende en CPW9M suplementado con hidroxurea 2 mM y se añaden 3 ml de CPW18S a la parte inferior de cada tubo. Los protoplastos vivos que se acumulan en la interfase entre las dos capas durante la centrifugación (10 minutos, temperatura ambiente, 85xg) se recogen y se evalúa su densidad utilizando un hemocitómetro. Los

15 protoplastos se recogen por centrifugación durante 5 min a 85x g a temperatura ambiente y se resuspenden en medio MaMG suplementado con hidroxurea 2 mM hasta una densidad final de 10<sup>6</sup> por ml.

### Transfección de protoplastos de tomates

#### 20 Formación de la huella genética (Ejemplo 1)

[0088] Para cada transfección, se mezclan 250000 protoplastos con 25 µg de ARN de doble cadena contra Ku70 de tomate y 250 µl de solución PEG (40% PEG4000 (Fluka # 81240), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,1 M, manitol 0,4 M). Se deja que proceda la transfección durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden cinco ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,275 M gota a gota y se mezclan a fondo. Se recogen los protoplastos transfectados por centrifugación durante 5 minutos a 85xg a temperatura ambiente y se lavan dos veces en CPW9M. Finalmente, los protoplastos se resuspenden en K8p suplementado con diclobenilo 2 mg/l e hidroxurea 2 mM hasta una densidad final de 250.000 por ml y se incuban durante la noche a 25°C en la oscuridad. La mañana siguiente se recogen los protoplastos por centrifugación a 85xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavan una vez en CPW9M suplementado con hidroxurea 2 mM y se aíslan los protoplastos vivos como se ha descrito anteriormente. Los protoplastos vivos se resuspenden en MaMG hasta una densidad final de 10<sup>6</sup> por ml y se transfectan como se ha descrito anteriormente con 20 µg de construcción de ZFN (Townsend et al. 2009 Nature). Los protoplastos se sumergen a continuación en alginato y se cultivan en medio de cultivo K8p.

#### 35 Modificación dirigida de genes (Ejemplo 2)

[0089] Para cada transfección, se mezclan 250000 protoplastos con 25 µg de ARN de doble cadena contra Ku70 de tomate, 20 µg de construcción de ZFN (Townsend et al. 2009 Nature) y 250 µl de solución de PEG (40% PEG4000 (Fluka # 81240), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,1 M, manitol 0,4 M). Se deja que proceda la transfección durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden cinco ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,275 M gota a gota y se mezclan a fondo. Se recogen los protoplastos transfectados por centrifugación durante 5 minutos a 85xg a temperatura ambiente y se lavan dos veces en CPW9M. Finalmente, los protoplastos se resuspenden en K8p suplementado con diclobenilo 2 mg/l e hidroxurea 2 mM hasta una densidad final de 250.000 por ml y se incuban durante la noche a 25°C en la oscuridad. La mañana siguiente se recogen los protoplastos por centrifugación a 85xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavan una vez en CPW9M suplementado con hidroxurea 2 mM y se aíslan los protoplastos vivos como se ha descrito anteriormente. Los protoplastos vivos se resuspenden en MaMg hasta una densidad final de 10<sup>6</sup> por ml y se transfectan como se ha descrito anteriormente con 20 µg de construcción donante. Los protoplastos se sumergen a continuación en alginato y se cultivan en medio de cultivo K8p.

#### 50 Detección de huellas genéticas (Ejemplo 1)

[0090] Después de 3 días de cultivo, se disuelven discos de alginato en citrato de sodio, los protoplastos se recogen por centrifugación y se congelan en nitrógeno líquido para la posterior extracción de ADN usando el kit de DNAeasy (Qiagen). El marco de lectura abierto de ALS longitud completa se amplifica mediante PCR usando la Taq polimerasa de comprobación de lectura, el producto de PCR se clona en el vector de clonación TOPO XL PCR (Invitrogen) y se transforma en células de E. coli competentes One Shot TOP10 (Invitrogen). Las bacterias se siembran en agar LB suplementado con carbenicilina 100 micras g/ml y se incuban durante la noche a 37°C. La mañana siguiente, se recogen 400 clones individuales y se utilizan para el análisis de curva de fusión de alta resolución en un aparato Light Cycler (Roche) para identificar clones con un desapareamiento en el locus ALS. Los clones positivos se confirman por secuenciación.

#### Detección de eventos de modificación dirigida de genes (Ejemplo 2)

[0091] Después de 14 días de cultivo, se cortan los discos de alginato en tiras de 5 mm y se colocan en la superficie de medio TM-DB solidificado con micro agar al 0,8% y suplementado con clorsulfurón 20 mM. Los callos resultantes de un evento de modificación dirigida de genes serán resistentes a clorsulfurón y se desarrollará en 6-8 semanas. Los callos resistentes se muestrean, el ADN se extrae utilizando el kit de Qiagen Plant DNA easy. La secuencia de codificación de longitud completa del gen ALS se amplifica por PCR y la presencia de mutaciones se confirma mediante secuenciación.

**EJEMPLO 3**

*Líneas celulares vegetales*

[0092] Se produjo una suspensión de células Brigh Yellow 2 de tabaco que contiene un gen EGFP no funcional mediante la introducción de una mutación puntual en la región cromóforo de la proteína que da lugar a la formación de un codón de parada prematuro. Esta línea se utiliza como sistema indicador para probar la influencia de diversos parámetros en la reparación del gen EGFP mediante reparación génica dirigida mediada por oligonucleótidos.

ATGGGAAGAGGATCGCATCACCACCATCATCATAAGCTTCCAAGAAGAAGAGGAAGGTT  
 CTCGAGATGGTGAGCAAGGGCTAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG  
 GACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC  
 GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCG  
 TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA  
 CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG  
 GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCT  
 GAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC  
 AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCG  
 CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC  
 GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC  
 CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGG  
 CATGGACGAGCTGTACAAGTAA [SEQ ID NO 7]

[0093] Secuencia de ADNc de la EGFP mutada (mEGFP), la posición de la mutación se indica subrayada y en negra (G a T)

Secuencias de oligonucleótidos de reparación y control

GFP 7	SEQ ID NO 8	T*G*A*A*T*CAGCTCCTCGCCCTTGC*C*A*C
GFP 8	SEQ ID NO 9	T*G*A*A*T*CAGCTCCTAGCCCTTGC*C*A*C

\* indican modificaciones con fosforotioato

**Aislamiento de protoplastos del tabaco**

[0094] Se transfieren cinco ml de un cultivo de suspensión de células Bright Yellow 2 (BY-2) de tabaco de 7 días de vida mantenida semanalmente en medio de cultivo de BY-2 (Nagata et al. 1999 Method Cell Sci) a un matraz Erlenmeyer de 50 ml que contiene 45 ml de medio de cultivo de BY-2 suplementado con hidroxurea 2 mM. Las células se dejan dividir durante 24 horas y se recogen por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al volumen de células empaquetadas, se añaden 25 ml de mezcla de enzimas para BY-2 (celulasa Onozuka RS al 1% (p/v), pectinasa Y23 al 0,05%, driselasa de *Basidiomycetes sp* al 0,2%) en MDE (0,25 g de KCl, 1,0 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,136 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g de polivinilpirrolidona (PM 10.000), 6 mg de ácido naftaleno acético y 2 mg de 6-bencilaminopurina en un volumen total de 900 ml. La osmolalidad de la solución se ajusta a 600 mOsm.kg<sup>-1</sup> con sorbitol, el pH a 5,7). Las células se transfieren a una placa de Petri de calidad TC y se deja proceder la digestión durante 4 horas a 25°C bajo agitación suave (40 rpm). La suspensión de protoplastos se filtra a través de un tamiz de acero inoxidable de malla de 50 µm y se recoge por centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos a 5°C. Los protoplastos se resuspenden en medio de lavado KC enfriado en hielo (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O al 0,2%, KCl al 1,7%, 540 mOsm.Kg<sup>-1</sup> con KCl, pH 5,7) suplementado con hidroxurea 2 mM y se centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos a 5°C. Los protoplastos se resuspenden en medio de lavado KC suplementado con hidroxurea 2 mM y se añaden 3 ml de CPW18S a la parte inferior de cada tubo. Los protoplastos vivos se acumularán en la interfase de los dos medios durante la centrifugación a 800 rpm durante 10 minutos a 5°C. Los protoplastos vivos se recogen y se evalúa su densidad utilizando un hemocitómetro. La densidad de los protoplastos se ajusta a 10<sup>6</sup> por ml utilizando medio de lavado KC enfriado en hielo.

**Transfección de protoplastos del tabaco**

5 [0095] La transfección de protoplastos del tabaco se lleva a cabo como para los protoplastos del tomate. Los protoplastos del tabaco se transfectan con 12,5 µg de dsARN contra MSH2 del tabaco. Los protoplastos transfectados se resuspenden en 2,5 ml de medio de cultivo To suplementado con hidroxurea 2 mM y diclobenilo 2 mg/l. El medio de cultivo To contenía (por litro, pH 5,7) a 950 mg de KNO<sub>3</sub>, 825 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 220 mg de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 185 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 85 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,85 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 37,25 mg de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, los micronutrientes de acuerdo con medio de Heller (Heller, R. 1953 Ann Sci Nat Bot Biol Veg), vitaminas según el medio de Morel y Wetmore (Morel, G. y R.H. Wetmore 1951 Amer. J. Bot.), sacarosa al 2% (p/v), 3 mg de ácido naftaleno acético, 1 mg de 6-bencilaminopurina y una cantidad de manitol para llevar la osmolalidad a 540 mOsm.kg<sup>-1</sup> y se transfiere a una placa de Petri de 35 mm. El día siguiente, los protoplastos se recogen por centrifugación y se lavan con medio de lavado KC enfriado en hielo suplementado con hidroxurea 2 mM y diclobenilo 2 mg/l. Los protoplastos vivos se recogen y se transfectan como se ha descrito anteriormente con 1,6 nmol de oligonucleótidos complementarios a la cadena transcrita y que contienen (GFP 7) o no (GFP 8) un desapareamiento con la secuencia diana. Los oligonucleótidos están protegidos de la degradación por nucleasas por 4 enlaces fosforotioato en los extremos 3' y 5'. Los protoplastos se resuspenden finalmente en medio de cultivo To sin hidroxurea o diclobenilo. Después de 24 horas, se puntúa la restauración de EGFP usando una Nikon Eclipse TS100-F equipada con cubo de filtro GFP de paso de banda y equipada con un objetivo CFI Super Plan Fluor ELWD 20XC.

**Resultados**

**Regulación por descenso de MSH2 de tabaco y tomate**

25 [0096] Los resultados se indican en la Figura 8. Los resultados demuestran que el nivel de ARNm de MSH aumenta después del aislamiento. La mayoría de los protoplastos de hoja derivan de células del mesófilo que no se dividen de forma activa. Después del aislamiento, las hormonas en el medio inducen la re-entrada de la célula en el ciclo celular y la consiguiente inducción de los niveles de genes MMR. La adición de un dsARN no específico (no comparte ninguna homología con MSH2) no afecta a los niveles de expresión, mientras que dsARN de MSH2 es eficaz en la reducción de los niveles de ARNm de MSH2 hasta el 5-20% del encontrado en protoplastos tras el aislamiento. Se encontraron resultados similares para el dsARN dirigido a MLH1 y KU70.

**Formación de la huella genética en el locus ALS de tomate (Ejemplo 1, Figura 5)**

35 [0097] Todas las muestras fueron tratadas con hidroxurea 2 mM (ver materiales y procedimientos)

Transfectada en el día 1 con:	Transfectada en el día 2 con:	Huellas genéticas únicas
-	-	0
dsARN contra Ku70	-	0
-	construcción de ZFN	0
tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	-	0
tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	construcción de ZFN	13
dsARN contra Ku70 + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	-	0
dsARN contra Ku70 + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	construcción de ZFN	53

**Eventos de modificación dirigida de genes en el locus ALS de tomate (Ejemplo 2, Figura 6)**

40 [0098]

Ejemplo 2: diseño experimental para la modificación dirigida de genes eficaz en protoplastos de plantas, véase la Figura 6. Todas las muestras fueron tratadas con hidroxurea 2 mM (ver materiales y procedimientos)

Transfectada en el día 1 con:	Transfectada en el día 2 con:	Callos resistentes (%)
-	-	0
dsARN contra Ku70 + construcción de ZFN	-	0
dsARN contra Ku70 + construcción de ZFN	construcción donante	0
dsARN contra Ku70 + construcción de ZFN + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	-	0

dsARN contra Ku70 + construcción de ZFN + construcción donante	-	0,02
dsARN contra Ku70 + construcción de ZFN + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	construcción donante	3,4

**Restauración de meGFP en protoplastos BY-2**

**[0099]**

5 Ejemplo 3: Diseño experimental para ODTNE eficiente en protoplastos de plantas. Ver Figura 7. Todas las muestras fueron tratadas con hidroxürea 2 mM (ver materiales y procedimientos)

Transfectada en el día 1 con:	Transfectada en el día 2 con:	Protoplastos positivos en GFP después de 24 horas (/10 <sup>6</sup> )
-	-	0
oligonucleótido de reparación	-	0
-	oligonucleótido de reparación	0
tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	oligonucleótido de reparación	2
dsARN de MSH2	oligonucleótido de reparación	0
dsARN de MSH2 + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	oligonucleótido de reparación	122
dsARN de MSH2 + tratamiento de noche con diclobenilo 2 mg/l	oligonucleótido sin desapareamiento	0

10 **[0100]** A partir de los ejemplos anteriores, es evidente que la optimización de la secuencia de eventos necesaria para la formación de la huella genética, la modificación dirigida de genes u ODTNE por medio de la inhibición de la pared celular conduce a mejoras sustanciales en todos los procesos descritos.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0101]**

- 15 <110> Keygene NV
- 20 <120> Técnicas mejoradas para la transfección de protoplastos
- <130> P30039EP01
- <150> US 61/288474
- 25 <151> 2009-12-21
- <150> NL2004020
- <151> 2009-12-24
- <160> 9
- 30 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 776
- 35 <212> ADN
- <213> Lycopersicon esculentum
- <220>
- 40 <221> misc\_feature
- <223> KU70
- <400> 1
- 45 ggaagatctg aacgaccagc ttaggaaacg catgtttaag aagcgcagag ttcgaagact 60
- tgcacttgta atttttaatg gattatctat cgaacttaac acctatgctt tgatccgtcc 120
- aactaatcca gggacaatta cttggcttga ttcgatgact aatcttcctt tgaagactga 180

ES 2 583 060 T3

gagaaccttc atatgtgctg atactggtgc tatagttcag gagcctctaa aacgctttca 240  
 gtcttacaaa aatgagaatg tcatcttttc tgcggatgag ctttcagaag tcaaaagagt 300  
 5 ttcaactgga catcttcgctc tgttgggctt caagcctttg agctgcttaa aagactatca 360  
 taacctgaag ccagcaactt ttgtctttcc cagtgatgag gaagtgggtg gaagcacttg 420  
 10 tcttttcggt gctctccaaa gatcaatggt gcggcttaag cgttttgag ttgctttcta 480  
 tgggaattta agtcatcctc aattgggtgc tcttgttgca caagatgaag taatgactcc 540  
 tagtgggtcaa gtcgagccac cagggatgca tctgatttat ctccatatt ctgatgatat 600  
 15 cagacatggt gaagagcttc atactgatcc taattccgtg cctcatgcca ctgatgacca 660  
 gataaagaag gcctccgctt tagtgagacg tattgacctc aaagattttt ctgtgtggca 720  
 20 atttgcta atctgcattgc agagacatta tgcagtatta caagctcttg cacttg 776  
  
 <210> 2  
 <211> 884  
 <212> ADN  
 25 <213> Nicotiana benthamiana  
  
 <400> 2  
 ggagctactg atagatcatt gattataatt gatgagttgg gccgtggtac atcaacctat 60  
 30 gatggctttg gtttagcttg ggctatattgt gagcacattg ttgaagaaat taaggcacca 120  
 acattgtttg ccaactcactt tcatgagctg actgcattgg ccaacaagaa tggtacaat 180  
 35 ggacataagc aaaatgctgg gatagcaaat tttcatgttt ttgcacacat tgacccttct 240  
 aatcgcaagc taactatgct ttacaagggt caaccagggt cttgtgatca gagttttggt 300  
 attcatgttg ctgaatttgc aaattttcca ccgagtgttg tggccctggc cagagaaaag 360  
 40 gcatctgagt tggaggattt ctctcctatt gccataattc caaatgacat taaagaggca 420  
 gcttcaaac ggaagagaga atttgaccct catgacgtgt ctagaggtag tgccagagct 480  
 45 cggcaattct tacaggattt ctctcagttg ccaactggata agatggatcc aagcgaggtc 540  
 aggcaacagt tgagcaaaaat gaaaaccgac ctggagaggg atgcagttga ctctcactgg 600  
 tttcagcaat tcttttagtt cttcagatta gaactatata ttctattctg tgaagcttgg 660  
 50 gggaatgata gtgatgggtt ttgtggatat aacttagcct aagtgtaaag tttcgtttaa 720  
 atccttacc caaacatgat tctctgtaat caggggactt ttgtatgcat cctgtgttaa 780  
 55 atagtaaagc ttatcttatg gtcagctaac attggtagta gtctattgaa ttattccttc 840  
 acaacgacta aacaaccttc cttctctta aaacacccta aact 884  
  
 <210> 3  
 60 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 65 <223> cebador  
  
 <400> 3  
 accagcttag gaaacgca 18

ES 2 583 060 T3

5 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> cebador  
  
 10 <400> 4  
 agcaccagta tcagcaca 18  
  
 15 <210> 5  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 5  
 cacacattga cccttctaataat cgc 23  
  
 25 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 agaaatcctc caactcagat gcc 23  
  
 35 <210> 7  
 <211> 786  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana benthamiana  
  
 40 <400> 7  
 atgggaagag gatcgcatca ccaccatcat cataagcttc caaagaagaa gaggaaggtt 60  
 45 ctcgagatgg tgagcaaggg ctaggagctg ttcaccgggg tggtgccat cctggtcgag 120  
 ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 180  
 acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 240  
 50 cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 300  
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 360  
 55 atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 420  
 accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 480  
 gggcacaagc tggagtataa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 540  
 60 aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 600  
 ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac 660  
 65 aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 720  
 atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 780  
 aagtaa 786

5 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> oligonucleótido mutagénico

15 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(4)  
 <223> nucleótidos modificados con fosforotioato

20 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (22)..(25)  
 <223> nucleótidos modificados con fosforotioato

<400> 8  
 tgaacagctc ctcgcccttg ctcac 25

25 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> oligonucleótido mutagénico

35 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(4)  
 <223> nucleótidos modificados con fosforotioato

40 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (22)..(25)  
 <223> nucleótidos modificados con fosforotioato

45 <400> 9  
 tgaacagctc cttagcccttg ctcac 25

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la introducción de una o más moléculas de interés en un protoplasto de célula vegetal que comprende las etapas de:
- 5 - proporcionar el protoplasto de la célula vegetal mediante degradación enzimática y/o eliminación de la pared celular de una célula vegetal;
  - realizar una primera transfección del protoplasto de la célula vegetal con una composición que es capaz de inducir una rotura del ADN de doble cadena;
  - 10 - realizar una segunda transfección del protoplasto de la célula vegetal con una o más moléculas de interés, en el que dicha una o más moléculas de interés se seleccionan del grupo que consiste en oligonucleótidos u oligonucleótidos mutagénicos;
  - permitir que se forme la pared celular;
- en el que la segunda transfección se lleva a cabo después de la primera transfección, en el que el procedimiento comprende además poner en contacto el protoplasto de la célula vegetal con una composición no enzimática que
- 15 - evita la formación (de nuevo) de la pared celular
  - antes o simultáneamente con la primera transfección; o
  - entre la primera y la segunda transfección, o
  - antes o simultáneamente con la segunda transfección
- y el procedimiento comprende además la etapa de eliminar la composición no enzimática que inhibe o evita la
- 20 - formación de la pared celular
  - antes o simultáneamente con la primera transfección, o
  - entre la primera y la segunda transfección, o
  - antes o simultáneamente con la segunda transfección, o
  - después de la segunda transfección,
- 25 y antes de que se deje formar la pared celular.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido mutagénico tiene una longitud entre 10 y 60 nucleótidos.
- 30 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la composición que es capaz de inducir una rotura de ADN de doble cadena se selecciona del grupo que consiste en nucleasas de dedos de zinc, meganucleasas o nucleasas efectoras TAL, construcciones de ADN que codifican nucleasas de dedos de zinc, construcciones de ADN que codifican meganucleasas, construcciones de ADN que codifican nucleasas efectoras TAL.
- 35 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el periodo de tiempo entre la primera transfección y la segunda transfección es por lo menos de 10, 30, 60 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 ó 24 horas.
- 40 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el periodo de tiempo entre la primera transfección y la segunda transfección es:
- menos de 96 horas;
  - de 1 hora a 72 horas;
  - de 2 a 48 horas;
  - 45 - de 4 a 42 horas;
  - de 12 a 36 horas.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento es para la modificación dirigida de genes y/o la mutagénesis dirigida.
- 50 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera transfección y/o la segunda transfección son una transfección mediada por PEG.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de
- 55 - sincronización de la fase del ciclo celular de la célula vegetal o del protoplasto de la célula vegetal, en el que:
  - a. la sincronización se consigue mediante el contacto de la célula vegetal o del protoplasto de la célula vegetal con un agente de sincronización, preferiblemente
  - antes, o simultáneamente con, la formación del protoplasto de la célula vegetal a partir de la célula vegetal; o
  - 60 - antes, o simultáneamente con, la primera transfección; o
  - antes, o simultáneamente con, la segunda transfección; o
  - entre la primera y la segunda transfección
- y/o
- 65 - b. el procedimiento comprende además una etapa de eliminación del agente de sincronización
  - antes de que se forme el protoplasto de la célula vegetal a partir de la célula vegetal; o
  - antes, o simultáneamente con, la primera transfección; o

- antes, o simultáneamente con, la segunda transfección; o
- entre la primera y la segunda transfección; o
- después o simultáneamente con, la segunda transfección.

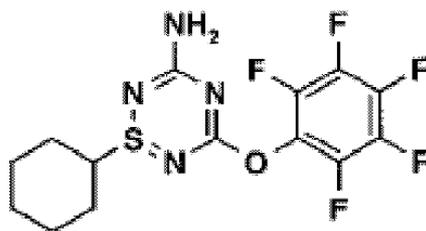
5 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la etapa de sincronización se realiza independientemente, tal como antes, después o simultáneamente con, la etapa de poner en contacto el protoplasto de la célula vegetal con una composición no enzimática que inhibe o evita la formación (de nuevo) de la pared celular.

10 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la composición no enzimática que inhibe la formación de paredes celulares contiene uno o más inhibidores de la formación de pared celular seleccionados del grupo que consiste en

- a. inhibidor de la biosíntesis de celulosa, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en diclobenilo, clortiamida, flupoxam, triazofenamida, ftoaxolina A, Ftoramicina, taxtomina A, brefeldina A;
- 15 b. inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam DCPA (clortal-dimetilo);
- c. inhibidor de la deposición de celulosa, preferiblemente quinclorac;
- d. otros inhibidores de la formación de la pared celular, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en morlin (7-etoxi-4-metil cromo-2-ona), isoxaben (CAS 82558-50-7, N-[3-(1-etil-1-metilpropil)-1,2-oxazol-5-il]-2,6-
- 20 dimetoxibenzamida), AE F150944 (N2-(1-etil-3-fenilpropil)-6-(1-fluoro-1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina), diclobenilo (diclorobenzonitrilo), calcofluor y/o calcofluor blanco (4,4'-bis ((4-anilino-6-bis (2-hidroxi-etil) amino-s-triazin-2-il) amino)-, ácido 2,2'-estilbenodisulfónico y sales del mismo), orizalina (CASRN - 19044-88-3, 4-(dipropilamino)-3,5-dinitrobenzenosulfonamida), 5-terc-butil-carbamiloxi-3-(3-trifluorometil)fenil-4-tiazolidinona, cumarina, 3,4 deshidroprolina,

25

30



35

40 cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam, DCPA (clortal-dimetilo), quinclorac.

45 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que  
 - la sincronización de la fase del ciclo celular sincroniza el protoplasto en la fase S, la fase M, la fase G1 y/o G2 del ciclo celular  
 y/o

- la sincronización de la fase del ciclo celular se consigue mediante la privación de nutrientes, tales como privación de fosfato, privación de nitrato, privación de iones, privación de suero, privación de sacarosa, privación de auxina.

50 12. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el agente de sincronización se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en afidicolina, hidroxurea, timidina, colchicina, cobtorina, dinitroanilina, benefina (benfluralina), butralina, dinitramina, etalfluralina, orizalina, pendimetalina, trifluralina, amiprofos-metilo, butamifos ditiopir, tiazopir propizamida = pronamida, tebutam DCPA (clortal-dimetilo), mimosina, anisomicina, amanitina, lovastatina, ácido jasmónico, ácido abscísico, menadiona, criptogeina, calor, peróxido de hidrógeno, permanganato de sodio, indometacina, epoxomicina, lactacisteína, icrf 193, olomoucina, roscovitina, bohemia, estaurosporina, K252a, ácido ocaidaico, endotal, cafeína, MG132, quinasas dependientes de ciclina e inhibidores de quinasas dependientes de ciclina.

55

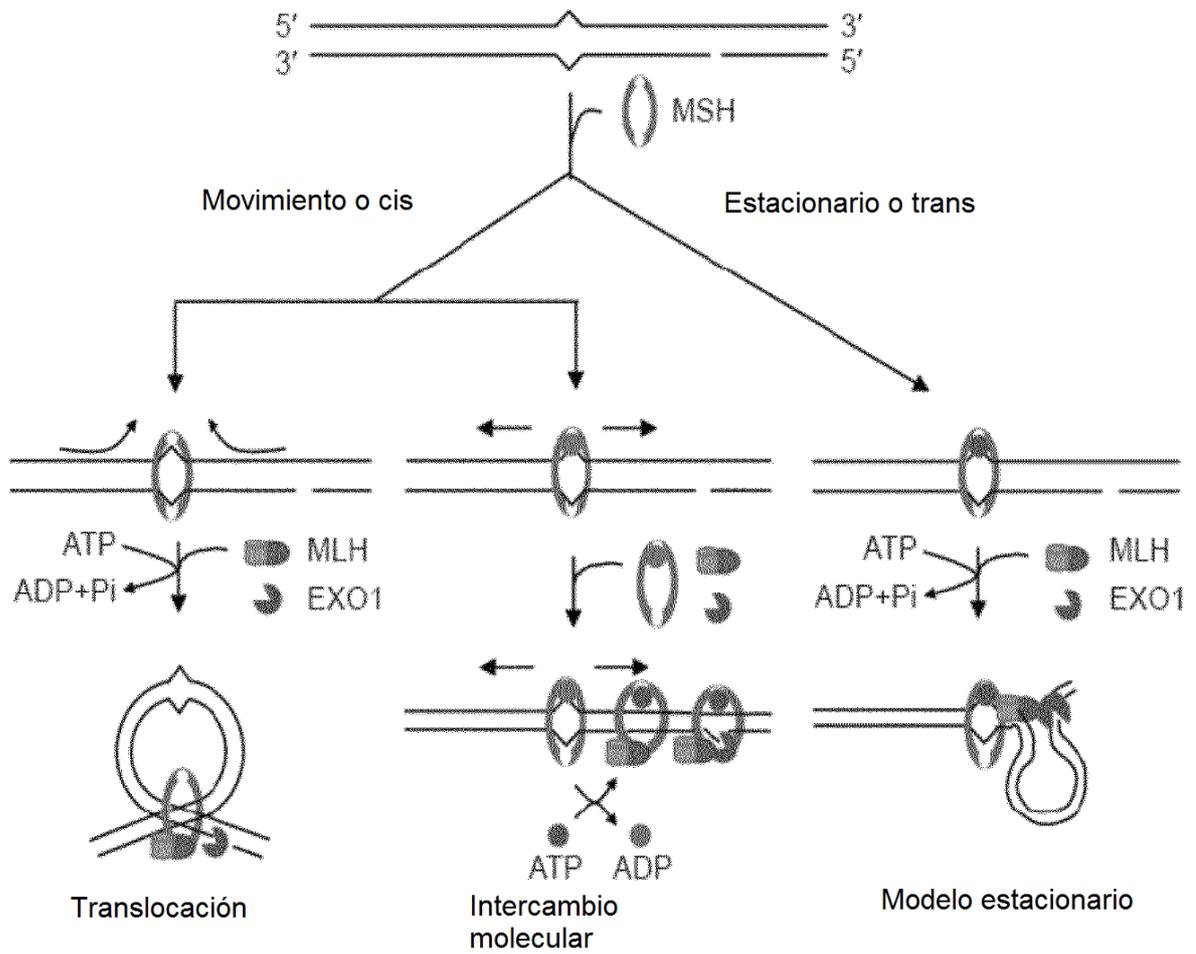


Figura 1

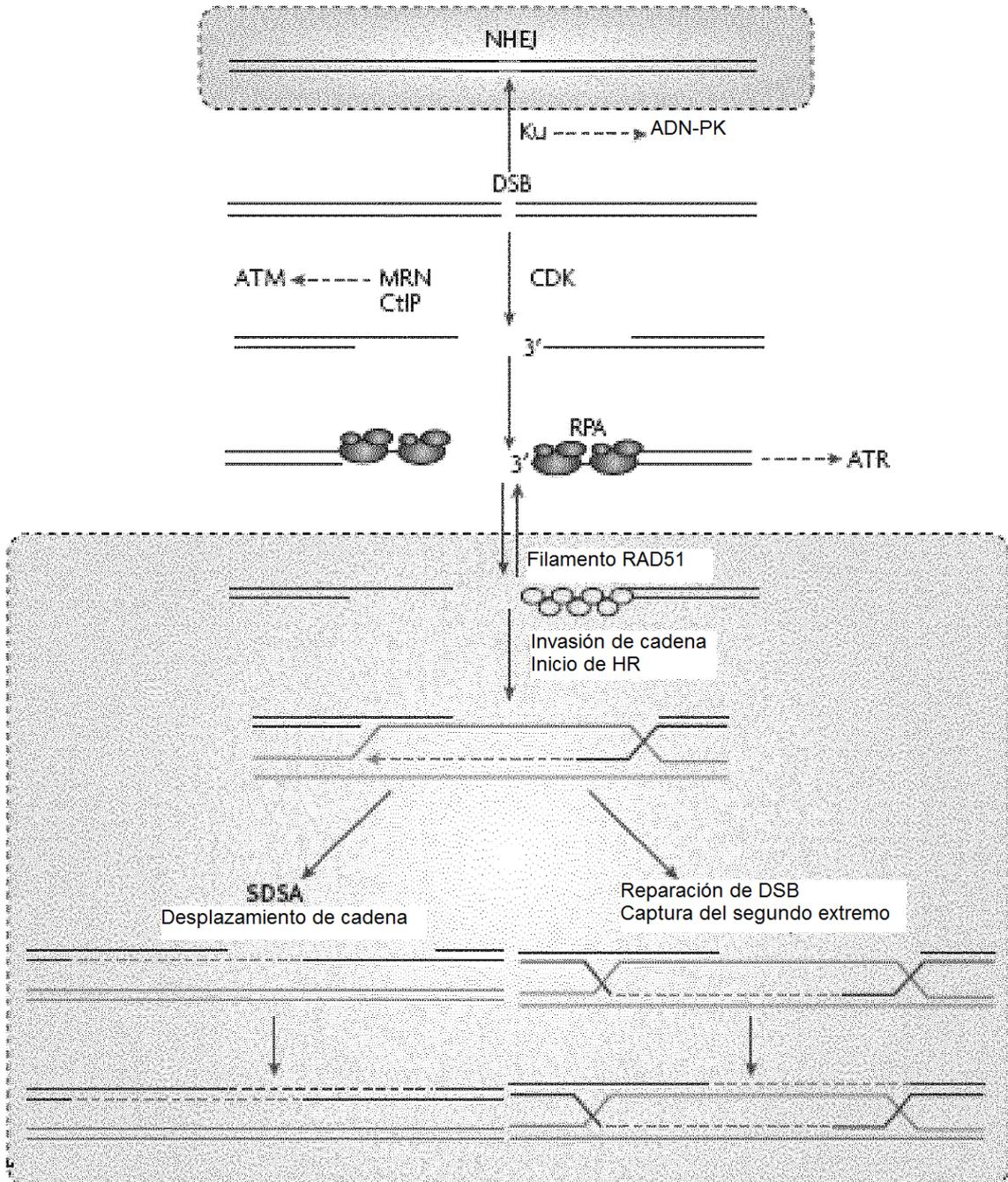


Figura 2

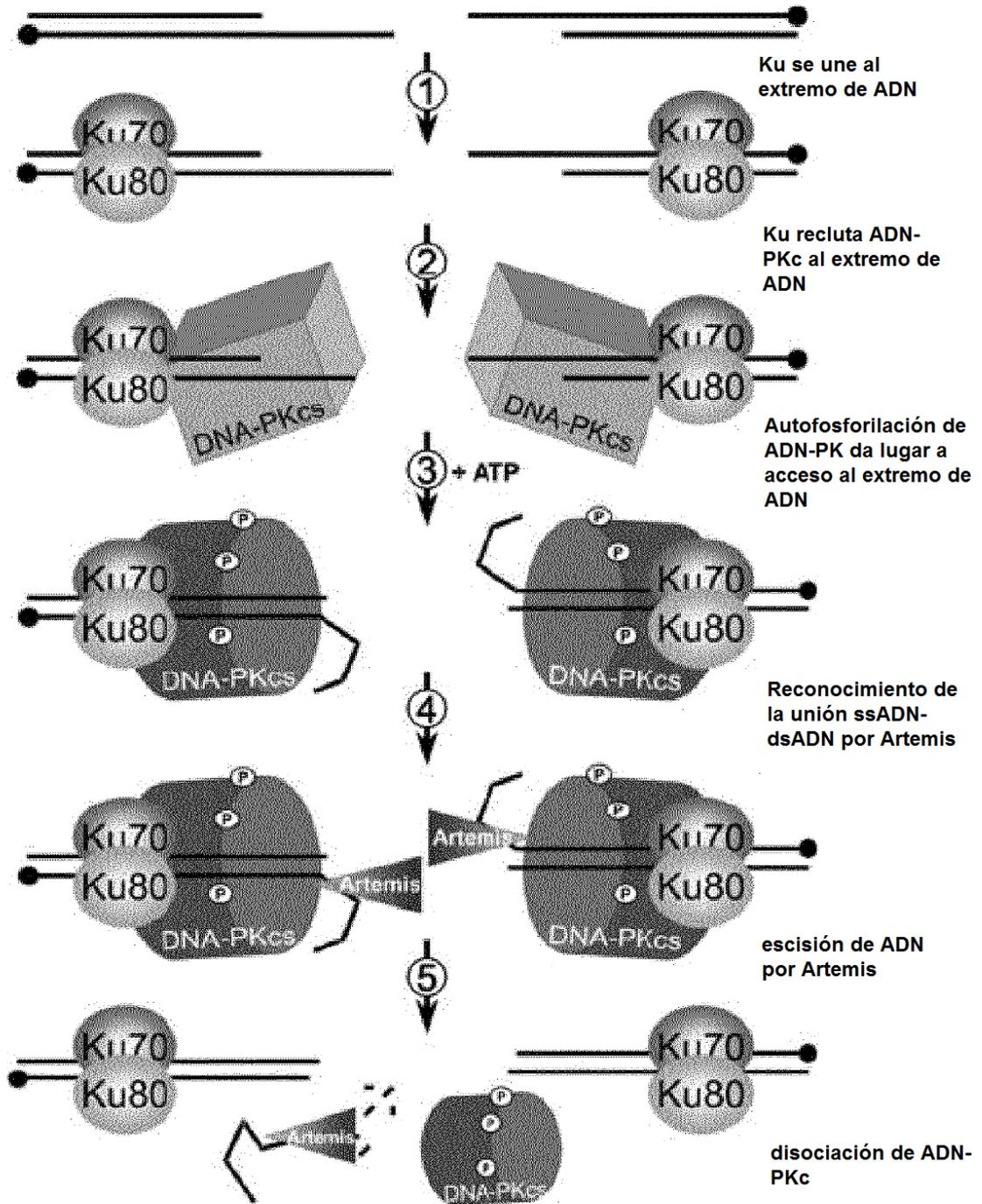


Figura 3

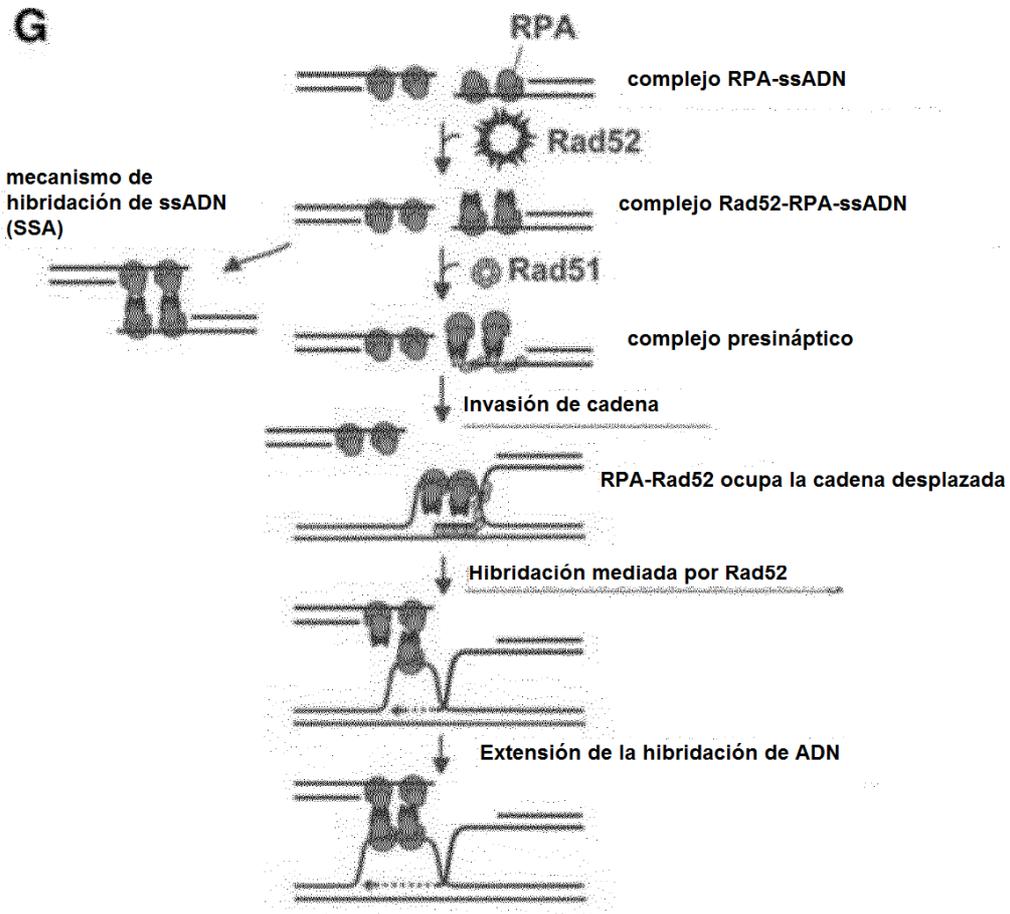


Figura 4

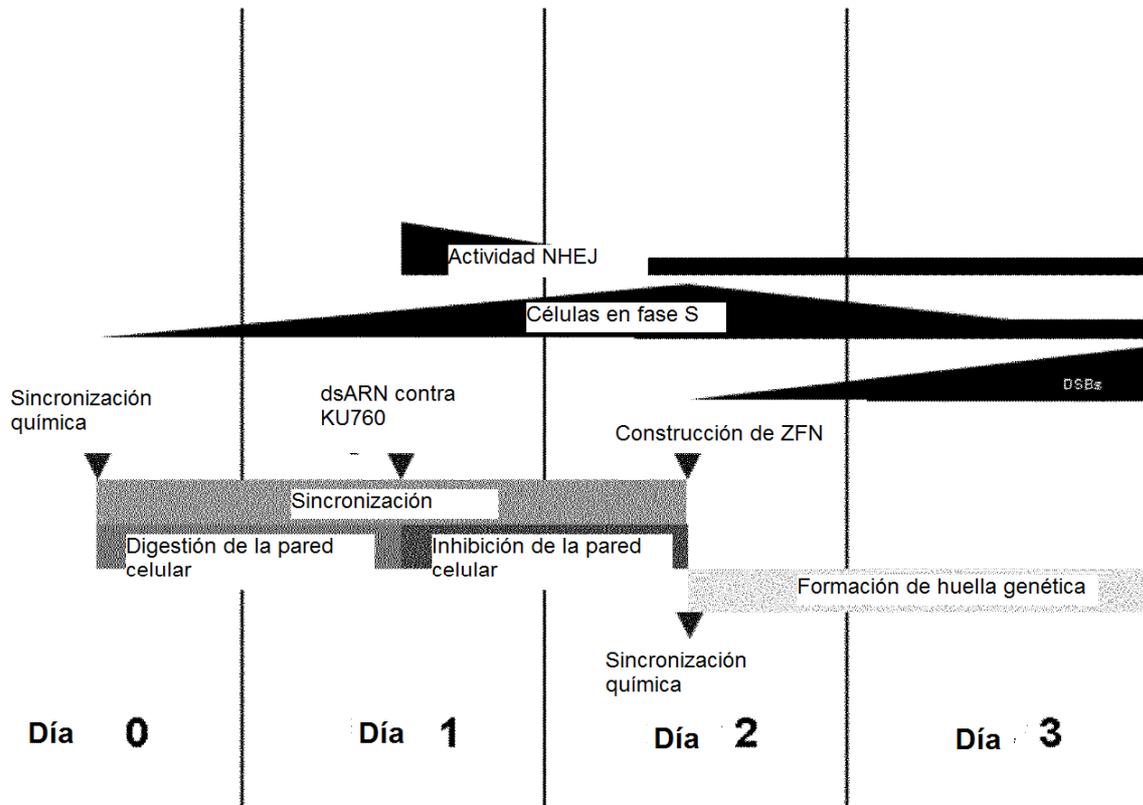


Figura 5

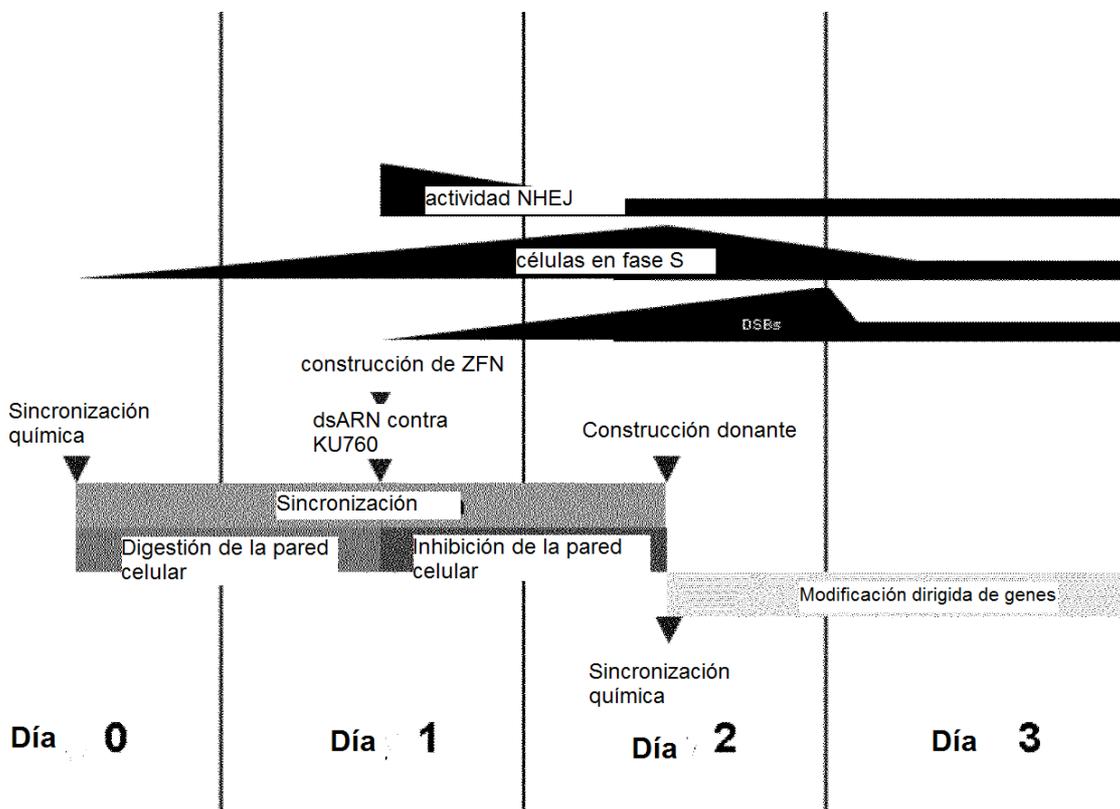


Figura 6

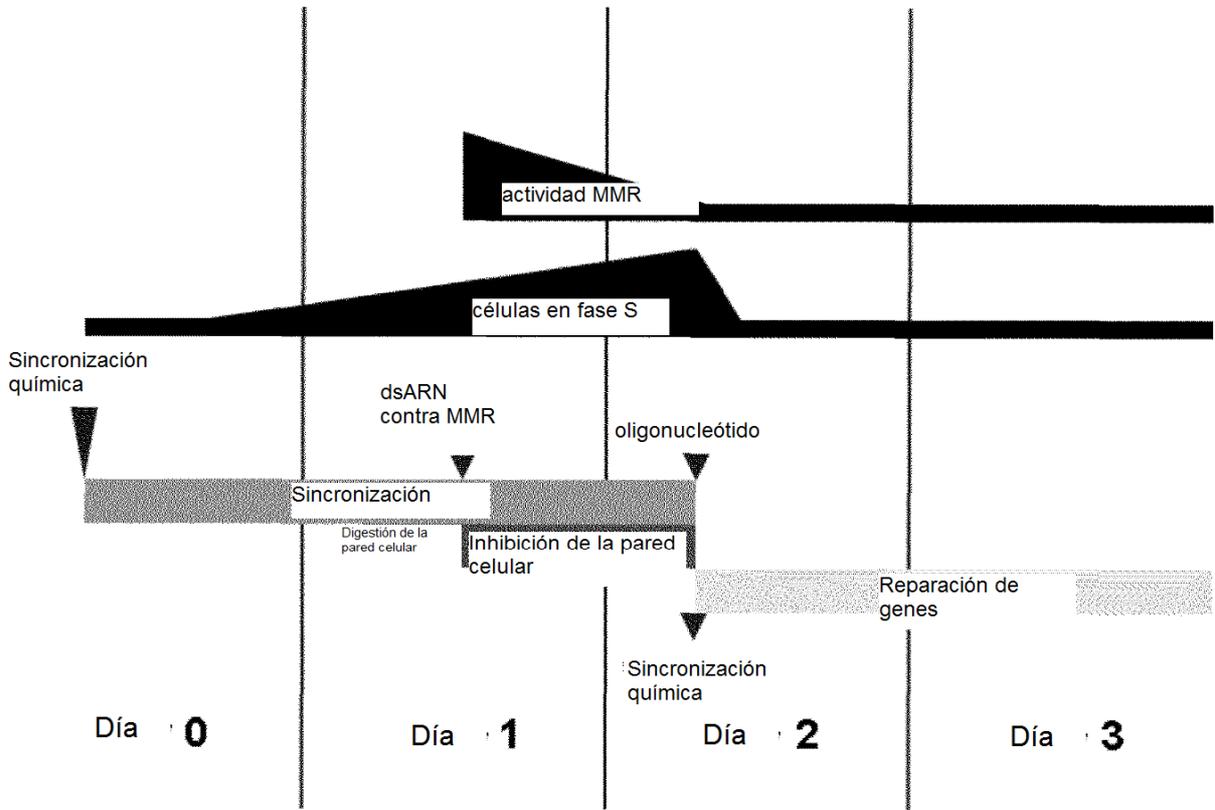


Figura 7

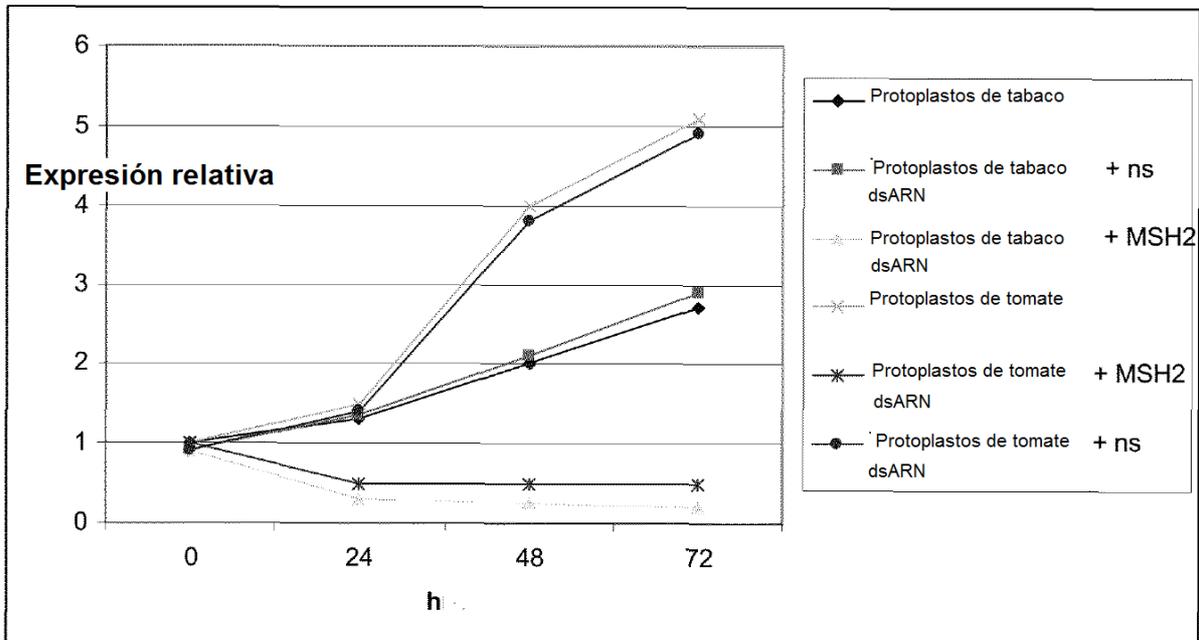


Figura 8