



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 052**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01N 43/38 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03762736 .1**

96 Fecha de presentación : **04.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1525217**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Péptido vegetal con actividad anti-microbiana.**

30 Prioridad: **05.07.2002 FR 02 08447**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2010

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Gallois, Patrick;
Hecht, Valérie;
Varoquaux, Fabrice;
Blanvillain, Robert;
Puertolas, Delphine;
Delorme, Valérie;
Roby, Dominique y
Delseny, Michel**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 346 052 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

Péptido vegetal con actividad anti-microbiana.

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos aislados, naturales o sintéticos, con actividad antimicrobiana, a los polinucleótidos que codifican dichos péptidos, a los vectores que comprenden dichos polinucleótidos, a los microorganismos y a las células transformadas con dichos vectores, a los organismos transgénicos no humanos de los que todas o parte de las células contienen y/o expresan dichos vectores, a las utilizaciones de dichos péptidos y de dichos polinucleótidos, particularmente como agentes anti-microbianos específicos de las plantas, así como a un
10 procedimiento de tratamiento anti-microbiano de las plantas.

En la técnica anterior se conocen péptidos de origen vegetal con actividad anti-microbiana. A este respecto, pueden mencionarse los péptidos con actividad lítica tales como defensinas, cecropinas, tioninas, melitinas, obtenidas de mamíferos o también defensinas, magaininas, attacinas, dipterinas, sapecinas, caerulinas, xenopsinas, aisladas a partir
15 de insectos. También se han descrito híbridos de estos péptidos.

También se han descrito péptidos de conejo por su actividad anti-microbiana, así como péptidos con actividad hidrolítica como quitinasa o β -1,3-glucanasa.

20 Entre los péptidos de origen vegetal, pueden mencionarse los descritos en las patentes WO 93/05153, US 6.147.281, US 6.150.588 o también US 5.424.395.

La solicitud WO 93/05153 describe proteínas aisladas a partir de semillas de plantas de las familias de las brasicáceas, de las compuestas y de las leguminosas, que presentan una actividad antifúngica y, para algunas, una actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas.
25

La patente US 6.147.281 describe péptidos que tienen una actividad anti-microbiana sobre los patógenos de plantas, presentes en las hojas marchitas de cebada. Estos péptidos presentan particularmente una actividad contra *Corynebacterium sepedonicum*.
30

La patente US 6.150.588 describe péptidos que tienen una actividad anti-microbiana sobre los patógenos de plantas que pueden aislarse a partir de semillas de *Aralia* o de *Impatiens*.

35 La patente US 5.424.395 describe péptidos derivados de magainina 2 que tienen una actividad anti-microbiana sobre patógenos de plantas.

Los péptidos presentes normalmente en las plantas y que presentan una actividad anti-microbiana constituyen una clase de agentes de lucha biológica contra los agentes patógenos particularmente interesante. La identificación de nuevos compuestos derivados de plantas, susceptibles de presentar una actividad anti-microbiana específica frente a las plantas permite prever el desarrollo de nuevos biopesticidas que constituyen una reserva de productos en caso de aparición de resistencia. Es en este marco donde se sitúa la presente invención.
40

De manera sorprendente e inesperada, los Inventores aislaron en *Arabidopsis thaliana* un péptido que presenta la particularidad de tener una actividad anti-microbiana, particularmente contra los agentes patógenos de las plantas. En su actividad anti-microbiana, dicho péptido presenta una actividad al menos bacteriostática, eventualmente bactericida. Muy particularmente, dicho péptido presenta una actividad anti-microbiana específica de algunas especies bacterianas, particularmente de especies patógenas de las plantas, como por ejemplo *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* o también *Erwinia amylovora*.
45

50 La actividad anti-microbiana puede manifestarse en forma de dos acciones distintas: inhibición "microbicida" (bactericida, virucida o fungicida), que consiste en matar a dichos microorganismos; e inhibición "microbiostática" (bacteriostática, virostática o fungistática) que consiste en reducir o en inhibir las capacidades de proliferación de dichos microorganismos.

55 Por consiguiente, la invención tiene por objeto un péptido aislado, natural o sintético, que comprende al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10 siguientes:

60 SEC ID N° 1: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁

SEC ID N° 2: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala

SEC ID N° 3: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe

SEC ID N° 4: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg

65 SEC ID N° 5: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu

SEC ID N° 6: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu-Arg

ES 2 346 052 T3

SEC ID N° 7: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu-Arg-Leu

SEC ID N° 8: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu-Arg-Leu-R₂

5 SEC ID N° 9: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu-Arg-Leu-R₂-His

SEC ID N° 10: Met-Trp-Trp-Leu-Val-Gly-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Leu-Ile-His-Leu-R₁-Ala-Phe-Arg-Glu-Arg-Leu-R₂-His-Leu

10

en las que R₁ y R₂ representan, independiente o simultáneamente, una cisteína o una serina.

El péptido de acuerdo con la invención comprende al menos la secuencia SEC ID N° 1.

15

De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, dicho péptido consiste en una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10, tales como se han definido anteriormente.

20 Por aislado, se entienden en este documento cualquier péptido, sea cual sea su origen, que se habrá, a partir de su fuente, sometido a al menos una etapa de enriquecimiento. De este modo, la invención abarca tanto extractos en bruto, por ejemplo, de vegetales o de células vegetales, que contienen al menos un péptido de acuerdo con la invención, como formas de éste mucho más puras.

25 De manera ventajosa, el péptido de acuerdo con la invención puede ser aislado de plantas (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*) u obtenido mediante síntesis química o también mediante medios biotecnológicos como, por ejemplo, a partir de microorganismos, de células de plantas o de animales, incluso de organismos modificados, que normalmente no expresan dicho péptido.

30 La invención también tiene por objeto un péptido aislado, cuya secuencia es sustancialmente homóloga a al menos una de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10, tales como se han definido anteriormente.

35 Se considera en este documento que un péptido presenta una secuencia sustancialmente homóloga cuando su secuencia de aminoácidos presenta al menos el 60% de similitud con la secuencia de aminoácidos de al menos una de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10 y que el péptido ha conservado su actividad inicial anti-microbiana, particularmente su actividad específica frente a microorganismos patógenos de plantas.

40 Por 60% de similitud entre un péptido P y las secuencias SEC ID N° 1 a 10, se entiende que, cuando los dos péptidos están alineados, el 60% de los aminoácidos de P son idénticos al aminoácido correspondiente de las secuencias SEC ID N° 1 a 10, o se sustituyen por un aminoácido del mismo grupo.

Por aminoácido del mismo grupo, se entiende un aminoácido que posee propiedades químicas prácticamente idénticas. En particular, se entiende por esta expresión aminoácidos que tienen prácticamente la misma carga y/o el mismo tamaño, y/o la misma hidrofilia o hidrofobicidad y/o la misma aromaticidad.

45 Dichos grupos de aminoácidos incluyen particularmente;

(i) glicina, alanina

(ii) isoleucina, leucina, valina

50

(iii) triptófano, tirosina, fenilalanina

(iv) ácido aspártico, ácido glutámico

55

(v) arginina, lisina, histidina

(vi) serina, treonina

60 Pueden preverse otras sustituciones, en las que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido comparable pero no natural (hidroxiprolina, norleucina, ornitina, citrulina, ciclohexilalanina, aminoácidos dextrógiros....).

65 El hecho de que el péptido de acuerdo con la invención presente las propiedades anti-microbianas descritas anteriormente permite prever su utilización como agente anti-microbiano, particularmente dirigido contra los agentes patógenos de plantas. Muy particularmente, el péptido de acuerdo con la invención puede utilizarse como agente bacteriostático, eventualmente bactericida, aún más particularmente como agente anti-microbiano específico de *Xanthomonas campestris*, de *Pseudomonas syringae* o también de *Erwinia amylovora*. Esto permite prever su utilización como biopesticida, que no presenta efectos secundarios tóxicos sobre el medioambiente.

ES 2 346 052 T3

La invención también tiene por objeto la utilización de un péptido, aislado, que comprende o que consiste en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10, como agente anti-microbiano, particularmente dirigido contra los agentes patógenos de plantas.

5 De acuerdo con una realización ventajosa de dicha utilización, dicho péptido de acuerdo con la invención es un agente bacteriostático, eventualmente bactericida, y aún más particularmente un agente anti-microbiano específico de *Xanthomonas campestris*, de *Pseudomonas syringae* o de *Erwinia amylovora*.

De manera sorprendente, los Inventores han demostrado que:

- 10
- los péptidos de acuerdo con la invención que comprenden o que consisten en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10, en las que R₁ representa una serina, conserva su actividad anti-microbiana;

15

 - los péptidos de acuerdo con la invención que comprenden o que consisten en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 2 a SEC ID N° 10, en las que R₁ representa una cisteína o una serina y R₂ representa una cisteína, presentan una actividad citotóxica;

20

 - los péptidos de acuerdo con la invención que comprenden o que consisten en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 8 a 10, en las que R₁ representa una cisteína y R₂ representa una serina, presentan una actividad citotóxica fuertemente reducida, incluso inhibida, mientras que la actividad anti-microbiana se conserva;

25

 - los péptidos de acuerdo con la invención que comprenden o que consisten en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 8 a 10, en las que R₁ y R₂ representan simultáneamente una serina, presentan una actividad citotóxica.

30 La actividad citotóxica del péptido de acuerdo con la invención se pierde cuando el péptido comprende o consiste únicamente en la secuencia SEC ID N° 1.

Por consiguiente, la presente invención también tiene por objeto la utilización de al menos un péptido que comprende o que consiste en al menos una de las secuencias SEC ID N° 2 a SEC ID N° 10, en las que R₁ representa una cisteína o una serina y R₂ representa una cisteína, o cuando comprende o consiste en al menos una de las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que R₁ y R₂ representan simultáneamente una serina, como agente citotóxico, particularmente como agente citotóxico para las células vegetales.

La presente invención también tiene por objeto la utilización del péptido de acuerdo con la invención que comprende o que consiste en al menos una de las secuencias SEC ID N° 2 a SEC ID N° 10, en las que R₁ representa una cisteína o una serina y R₂ representa una cisteína, o cuando comprende o consiste en al menos una de las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que R₁ y R₂ representan simultáneamente una serina, como agente herbicida.

La invención también tiene por objeto la utilización del péptido de acuerdo con la invención cuando comprende o consiste en al menos una de las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que R₁ representa una cisteína y R₂ representa una serina, como agente anti-microbiano no citotóxico, particularmente dirigido contra los agentes patógenos de plantas.

De manera ventajosa, las funciones carboxilo y amino libres de los péptidos de acuerdo con la invención pueden estar protegidas.

50 Los grupos protectores habituales se conocen bien. Por ejemplo, el péptido de acuerdo con la invención puede ser un péptido para el que el grupo carboxilo C-terminal, y eventualmente los otros grupos carboxilo presentes en la molécula, están en forma de un éster (éster de alquilo inferior que tiene de 1 a 4 carbonos) o de una amida, y/o aquel para el que el grupo amino N-terminal, y eventualmente los otros grupos amino presentes en la molécula, están en forma acilada (por ejemplo acetilada). Más generalmente, la invención incluye no solamente las sales de adición del péptido con sales orgánicas carboxílicas y acetatos, sino también otras sales de adición tales como, por ejemplo, trifluoroacetatos, así como las sales de adición del péptido con ácidos minerales tales como sulfatos, clorhidratos, etc. La invención también incluye las sales que resultan de la salificación del (o de los) grupo carboxilo, y particularmente las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como las sales de sodio o de calcio.

60 La invención también tiene por objeto una composición que comprende al menos un péptido que comprende o que consiste en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10, tales como se han descrito anteriormente y al menos un vehículo apropiado.

65 La composición de acuerdo con la invención puede ser una composición de uso alimentario, farmacéutico, veterinario (composición anti-microbiana o conservante) o, por supuesto, también una composición de uso agrícola (biopesticida y/o herbicida).

ES 2 346 052 T3

La invención también tiene por objeto un polinucleótido aislado, natural o sintético, caracterizado por que consiste en al menos una secuencia que codifica al menos uno de los péptidos de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización ventajosa de dicho polinucleótido, éste comprende al menos una de las secuencias SEC ID N° 11 a SEC ID N° 20 siguientes:

SEC ID N° 11: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃

SEC ID N° 12: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA

SEC ID N° 13: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT

SEC ID N° 14: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA

SEC ID N° 15: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG

SEC ID N° 16: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG CGT

SEC ID N° 17: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG CGT CTC

SEC ID N° 18: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG CGT CTC R₄

SEC ID N° 19: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG CGT CTC R₄ CAT

SEC ID N° 20: ATG TGG TGG CTA GTT GGA CTT ACA CCA GTT GAG
TTG ATC CAT CTT R₃ GCA TTT CGA GAG CGT CTC R₄ CAT CTC

en la que R₃ y R₄ representan, independiente o simultáneamente, un codón cisteína o un codón serina.

De acuerdo con una disposición ventajosa de esta realización, el polinucleótido de acuerdo con la invención consiste en una de las secuencias SEC ID N° 11 a SEC ID N° 20, en la que R₃ y R₄ representan un codón cisteína o un codón serina.

El polinucleótido de acuerdo con la invención puede estar en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN), de cadena sencilla o de cadena doble.

El polinucleótido de acuerdo con la invención puede deducirse de la secuencia de uno cualquiera de los péptidos de acuerdo con la invención y sintetizarse con ayuda de un sintetizador de ADN. El polinucleótido también puede obtenerse a partir de bancos de ADN, particularmente de bancos de ADN de células vegetales, muy particularmente a partir de un banco de ADN de células de *Arabidopsis thaliana*.

La invención también tiene por objeto una composición que comprende, en un medio apropiado, al menos un polinucleótido, tal como se ha descrito anteriormente, y al menos un vehículo apropiado.

Para la expresión de dichos péptidos de acuerdo con la invención, los polinucleótidos pueden introducirse ventajosamente en un vector apropiado.

El vector utilizado puede ser cualquier vector conocido de la técnica anterior. Particularmente, pueden mencionarse como vectores utilizables de acuerdo con la invención plásmidos, virus o también bacteriófagos.

ES 2 346 052 T3

Entre los plásmidos utilizables de acuerdo con la invención, pueden mencionarse los descritos por R. L. Rodriguez y D. T. Denhardt (A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, 1998) o también por J. Sambrook *et al.*, (Molecular cloning, Cold Spring Arbor, 2001).

5 Particularmente, pueden utilizarse ventajosamente los vectores pMOSBlue[®], comercializados por la compañía Amersham, los vectores pGEM[®]-T y pGEM[®]-T easy comercializados por la compañía Promega o también los plásmidos del tipo *Agrobacterium* Ti (H. De Greve *et al.*, J. Mol., Appl. Genet., 1, (1982), 499-511).

10 Dicho vector puede comprender además todas las secuencias reguladoras necesarias para la replicación del vector y/o la expresión del péptido codificado por el polinucleótido (promotor, sitios de terminación, etc.).

15 En una construcción particularmente interesante, el polinucleótido de acuerdo con la invención se sitúa dependiendo de un promotor inducible, haciendo de este modo a la síntesis del péptido dependiente de condiciones predefinidas, por ejemplo de condiciones medioambientales, de la presencia de un agente patógeno o de un agente químico.

La invención también tiene, por lo tanto, por objeto un vector que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos tales como se han descrito anteriormente, que comprende o que consiste en al menos una de las SEC ID N° 11 a SEC ID N° 20 en las que R₃ y R₄ representan, independiente o simultáneamente, un codón cisteína o un codón serina.

20 La invención tiene, además, por objeto la utilización de un polinucleótido o de un vector tales como se han descrito anteriormente para la preparación de un péptido de acuerdo con la invención.

La invención también tiene por objeto un sistema biológico modificado en el que se ha introducido al menos un polinucleótido de acuerdo con la invención o al menos un vector de la invención.

25 Dicho sistema biológico puede ser, por ejemplo, un microorganismo, como una bacteria tal como *Escherichia coli*, un endofito como los descritos en las Solicitudes Internacionales WO90/13224 WO91/10363, WO87/03303, WO94/16076 o también la Solicitud de Patente EP-125468 o también una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, una célula como, por ejemplo, una célula de insecto, una célula animal o una célula vegetal.

30 La invención también tiene por objeto la utilización del polinucleótido de acuerdo con la invención y/o del vector de la invención para la preparación de un sistema biológico modificado, pudiendo ser éste un microorganismo, un endofito, una levadura o una célula eucariota.

35 La invención también tiene por objeto una composición que comprende al menos un sistema biológico tal como se ha descrito anteriormente y al menos un vehículo apropiado.

40 La invención también tiene por objeto la utilización de al menos un sistema biológico modificado tal como se ha descrito anteriormente o de una composición que comprende al menos un sistema biológico modificado tal como se ha descrito anteriormente, para la preparación de una composición de agente anti-microbiano, particularmente dirigida contra los agentes patógenos de plantas, y/o de una composición citotóxica.

45 El sistema biológico modificado puede eventualmente permitir además la secreción del péptido de acuerdo con la invención en un medio de cultivo, lo que hace su extracción y su purificación más fáciles.

La introducción del polinucleótido y/o del vector de acuerdo con la invención en el sistema biológico modificado huésped, puede realizarse mediante cualquier método conocido, como por ejemplo transfección, infección, fusión, electroporación, microinyección o también biolística.

50 La invención también tiene por objeto un organismo transgénico no humano del que todas o parte de las células contienen el polinucleótido de acuerdo con la invención o el vector de la invención, en una forma libre o integrada.

Particularmente, el organismo transgénico de la invención es un vegetal transgénico.

55 El vegetal transgénico puede pertenecer a cualquier especie vegetal, particularmente a una especie vegetal susceptible de ser infectada por *Xanthomonas campestris* y/o *Pseudomonas syringae* y/o *Erwinia amylovora*.

60 Pueden mencionarse, como ejemplo, para *Xanthomonas campestris*, col, alfalfa, soja, algodón, guisante o también los cereales, para *Erwinia amylovora*, peral, manzano o también patata y para *Pseudomonas syringae*, banana, trigo o también los vegetales de la familia de los cítricos.

65 El organismo transgénico de la invención, particularmente el vegetal transgénico, cuando expresa el péptido de acuerdo con la invención, presenta una resistencia mejorada a los patógenos, particularmente a los fitopatógenos, muy particularmente a *Xanthomonas campestris* y/o *Pseudomonas syringae* y/o *Erwinia amylovora*.

La invención también tiene, por lo tanto, por objeto un organismo transgénico no humano, particularmente un vegetal transgénico que presenta una resistencia mejorada a los patógenos, particularmente a los fitopatógenos, muy particularmente a *Xanthomonas campestris* y/o *Pseudomonas syringae* y/o *Erwinia amylovora*.

ES 2 346 052 T3

Cualquier método de preparación de organismo transgénico, particularmente los métodos aplicados a los vegetales, pueden utilizarse para la preparación de los organismos transgénicos de la invención.

5 A este respecto, pueden mencionarse los métodos descritos en el documento Plant gene Transfer and Expression Protocols - Methods in Molecular Biology (Humana Press, H. Jones editor, 1995, 49: 39-48) o también los descritos por P. Gallois *et al.*, en el documento Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols - Methods in Molecular Biology, (Humana Press, J.A. Nickoloff editor, 1995, 55, 89-108).

10 La ventaja de los organismos transgénicos de la invención se basa en el hecho de que estos expresan de manera constitutiva el péptido anti-microbiano, de la invención.

La invención también tiene por objeto un anticuerpo, policlonal o monoclonal, dirigido contra al menos uno de los péptidos de acuerdo con la invención.

15 Cualquier método de preparación de los anticuerpos conocido de la técnica anterior puede emplearse para obtener los anticuerpos de la invención.

20 La invención tiene, además, por objeto un procedimiento de detección del polipéptido de acuerdo con la invención, caracterizado por que, en una primera etapa, se pone en contacto un medio susceptible de contener dicho péptido y un anticuerpo de acuerdo con la invención y, en una segunda etapa, se detectan los complejos formados por el anticuerpo y el péptido. Este procedimiento es particularmente interesante para detectar restos de biopesticidas en un entorno particular.

25 La invención también tiene por objeto un procedimiento de tratamiento anti-microbiano, y/o citotóxico en el que se pone en contacto mediante cualquier medio apropiado (aplicación, abono, pulverización,...) un organismo, particularmente un vegetal, y al menos un agente anti-microbiano y/o citotóxico seleccionado entre al menos uno de los péptidos tales como se han descrito anteriormente y/o uno de los vectores y/o uno de los polinucleótidos y/o uno de los sistemas biológicos y/o una composición, descritos anteriormente.

30 En agricultura, el procedimiento de tratamiento de la invención puede aplicarse de acuerdo con todas las formas utilizadas en agricultura, como por ejemplo de forma tradicional en aplicación externa en el campo, por ejemplo mediante pulverización o abono de una composición líquida de la invención, en aditivo de envoltura de semillas o en una estrategia de plantas transgénicas.

35 Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos de realización de la invención así como a los dibujos adjuntos, en los que:

40 - La figura 1 presenta los resultados obtenidos durante una amplificación por PCR en los ADN complementarios obtenidos a partir de ARN de silicuas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*.

45 - La figura 2 presenta los resultados de los ensayos realizados con intención de demostrar la presencia del (o de los) codones de iniciación (ATG) funcionales en el transcrito SUP25. En el panel 2A, la flecha indica la posición de los ATG y el octógono la posición de los codones de terminación.

- La figura 3 presenta los resultados de un test de fototoxicidad del péptido (SUP16) de 16 aminoácidos que consiste en la secuencia SEC ID N° 1 y del péptido (SUP25) de 25 aminoácidos que consiste en la secuencia SEC ID N° 10.

50 - La figura 4 presenta los resultados de los ensayos realizados con intención de determinar la concentración óptima para la actividad citotóxica del péptido (SUP25) de 25 aminoácidos que consiste en la secuencia SEC ID N° 10.

- Las figuras 5A a 5B presentan los resultados de un experimento de marcado TUNEL en protoplastos sometidos a diferentes variantes del péptido.

55 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no la limitan de ninguna manera.

Ejemplo 1

60 *Material y Métodos*

1) *Nomenclatura*

65 SUP25 y pep25 designan el péptido de 25 aminoácidos correspondiente a la secuencia SEC ID N° 10.

SUP16 y pep16 designan el péptido de 16 aminoácidos correspondiente a la secuencia SEC ID N° 1.

PepDS designa un péptido SUP25 cuyos aminoácidos 4 a 15 se han retirado.

ES 2 346 052 T3

Pep1S designa un péptido SUP 25 cuya cisteína en posición 23 se ha sustituido por una serina.

Pep2S designa un péptido SUP 25 cuyas cisteínas en posición 16 y 23 se han sustituido cada una por una serina.

5
2) *Material vegetal*
Todos los experimentos se realizaron en *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron dos ecotipos silvestres:

10 ➤ Columbia (Col-0) para el conjunto de las transformaciones mediante el método *in planta*.

➤ C24, ecotipo que ha servido para la confección de la trampa del promotor.

15 3) *Material bacteriano*

Escherichia coli: cepa DH5ct

20 *Xanthomonas campestris* pv *campestris*: cepa 8004

Pseudomonas syringae pv *tomato*: cepa DC3000

Erwinia amylovora: cepa 1430

25 4) *Material nucleico*

4.1. Plásmidos

30 4.1.a. *Plásmidos de clonación de fragmentos de PCR y de productos de digestión*

Los plásmidos que se utilizaron para clonar los fragmentos de PCR utilizando el principio del “TA cloning” son pMOSBlue[®], comercializado por la compañía Amersham, los vectores pGEM[®]-T y pGEM[®]-T easy comercializados por la compañía Promega. Estos tres vectores contienen el gen que otorga la resistencia a ampicilina a las bacterias que los contienen. Además, éstos portan el gen *lacZ* que permite una selección de los plásmidos que hayan incorporado efectivamente un inserto. Su huésped es la bacteria *E. coli* (DH5 α). Estos mismos plásmidos, encerrados sobre sí mismos, o también el vector pBluescript II SK[®] (pBSK, Stratagene), se utilizaron para la clonación de productos de digestión.

40 4.1.b. *Plásmidos de clonación utilizados como vector de transformación transitoria*

Todos los plásmidos mencionados anteriormente pueden servir como vector de expresión transitoria.

45 ➤ Para las fusiones traduccionales, el plásmido utilizado fue pRTL2-EGFP (Restrepo A, Freed DD, Carrington JC, Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell*. octubre de 1990; 2 (10): 987-98).

➤ Para la construcción de los casetes de expresión sentido y antisentido de la proteína SUP25, la amplificación por PCR del gen o del antisentido se realiza gracias a los cebadores pepS-3X y pepS-5H o pepAS-5S y PepAS-3H. El fragmento amplificado se clona en pGEM[®]-T, el inserto se escinde por las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* y después se inserta en pRTL2-EGFP linealizado por las mismas enzimas y se purifica en gel de agarosa.

55

60

65

ES 2 346 052 T3

4.2. Oligonucleótidos

Las secuencias de los cebadores utilizados se dan a continuación.

Nº	Nombre	Secuencia	Objeto
SEC ID Nº 21	PepS-5H	CAAGTAAGCTT GCTCAGTTG	Clonación de ORF SUP25 en fusión con los operadores en el vector binario
SEC ID Nº 22	PepS-3X	GCTCTAGATAC TTAGAGATGAC AGAGACG	Clonación de ORF SUP25 en fusión con los operadores en el vector binario
SEC ID Nº 23	PepAS-5S	ACTGAGCTCGT TGTATTTTAAAT CGAATGG	Clonación de anti SUP25 en fusión con los operadores en el vector binario
SEC ID Nº 24	PepAS-3H	ACGGAAGCTTT ACTTAGAGATG ACAGAGACG	Clonación de anti SUP25 en fusión con los operadores en el vector binario
SEC ID Nº 25	OTi-05	CGTCTTCGAGA AAAGTGTTAG	RT-PCR
SEC ID Nº 26	OEx-Ti-15	ATCAGTCAGAC AGTCAAATTC	RT-PCR
SEC ID Nº 27	OPend3	TACTTAGAGAT GACAGAGACG	RT-PCR

Otros cebadores comerciales como T7, T3, T7 term, SP6 y U19 se utilizaron de forma rutinaria en los experimentos de clonación.

5) Medios de cultivo y soluciones

5.1. Medio de cultivo para plantas

Medio de germinación MS: medio Murashige y Skoog con vitamina B5 (Duchefa) 2,2 g/l; MES (Sigma) 0,5 g/l; glucosa 5 g/l; pH 5,7 con KOH 1 M; Plant agar 7 g/l (Duchefa).

5.2. Medios de selección:

Antibióticos:

Kanamicina: 50 mg/l. (selecciona la actividad neomicina fosfotransferasa del gen *nptII*).

Higromicina: 30 mg/l. (selecciona la actividad higromicina fosfotransferasa del gen *hpt*).

Metotrexato: 0,1 mg/l (selecciona la actividad dihidrofolato reductasa del gen *dhfr*).

5.3. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Medio LB (Luria-Bertani) líquido: extracto de levadura 5 g/l; bacto triptona 10 g/l; NaCl 10 g/l.

Medio 2XL líquido: extracto de levadura 10 g/l; bacto triptona 20 g/l; NaCl 1 g/l; glucosa 2 g/l.

Medio Terrific Broth líquido: extracto de levadura 24 g/l; bacto triptona 12 g/l; glicerol 4 ml/l; KH₂PO₄ 4,62 g/l; K₂HPO₄ 25,08 g/l.

Medios sólidos: como los medios líquidos + 15 g/l Bacto agar (Difco).

Antibióticos para *E. coli*: ampicilina: 100 mg/l; kanamicina: 50 mg/l; cloranfenicol (solución madre en etanol): 12,5 mg/l.

ES 2 346 052 T3

5.4. Soluciones y tampones

5.4.a. Tampones relativos a las extracciones de ácidos nucleicos

5 Tampón de extracción del ADN genómico de la planta:

Método Dellaporta: Tris-HCl (pH 8) 100 mM; EDTA (pH 8) 50 mM; NaCl 0,5 M; β -mercaptoetanol 10 mM.

10 Tampón de extracción del ARN de la planta (REB): Tris-HCl (pH 8) 25 mM; EDTA 25 mM; NaCl 75 mM; SDS al 1%.

Tampón TE: Tris-HCl (pH 8) 10 mM; EDTA (pH 8) 2 mM.

15 5.4.b. Tampones relativos a la electroforesis en geles de agarosa

➤ Geles de ADN

20 Tampón TBE: Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA (pH 8) 2 mM.

Tampón TAE: Tris-HCl 40 mM; ácido acético 40 mM; EDTA (pH 8) 1 mM.

Tampón de carga de ADN 10x: xileno cianol FF al 0,25%; azul de bromofenol al 0,25%; glicerol al 30%.

25 ➤ Geles de ARN

Tampón MOPS 5x: MOPS 0,1 M; acetato de sodio 40 mM; EDTA (pH 8) 5 mM.

30 Tampón de carga de ARN, por muestra: tampón MOPS 5x 2 μ l; formaldehído 3,5 μ l; formamida 10 μ l, bromuro de etidio (BET) a 1 mg/ml 0,2 μ l.

35 5.4.c. Tampones relativos a las hibridaciones tipo transferencia de Southern

Tampón de despurinación: HCl 0,25 N.

Tampón de desnaturalización: NaOH 0,5 N - NaCl 1,5 M.

40 SSC 20 x: NaCl 3 M; citrato de sodio 0,3 M.

SSPE 20 x: NaCl 3,6 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA (pH 7,7) 0,02 M.

45 Denhardt's 50 x: FicollTM 10 g/l; PVP (polivinilpirrolidona) 10 g/l; BSA 10 g/l.

Tampón de hibridación: EDTA 10 mM; SSPE 6x ; SDS al 0,5%; Denhardt's 5x.

Tampón de lavado I: SSC 2x; SDS al 0,1%.

50 Tampón de lavado II: SSC 1x; SDS al 0,1%.

5.4.d. Tampones relativos al estudio de la actividad enzimática GUS

55 ➤ Histoquímica

Tampón de coloración GUS: KH₂PO₄ 40 mM; KHPO₄ 60 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indoilglucurónido (X-gluc, Biosynth AG, Suiza) en solución en dimetilformamida (DMF) 1 mg/ml; azida de sodio al 0,02%; NaCl 50 mM; ferrocianuro de sodio 0,5 mM; ferrocianato de sodio 0,5 mM; Triton X 100 al 0,1% (v/v).

60

➤ Espectrofotometría

65 Tampón de extracción GUS o GFP: Tris-HCl (pH 7) 50 mM; SDS al 0,1%; EDTA 10 mM; ditiotreitól (DTT) 3 mM.

ES 2 346 052 T3

5.4.e. Tampones para las inmunolectrotransferencias de proteínas

Tampón de extracción para inmunolectrotransferencias: Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM; NaCl 10 mM.

5 Tampón de carga en gel de acrilamida: Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM; SDS al 4%; glicerol al 10%; DTT 0,2 M; azul de bromofenol al 0,2%.

Colorante al Azul de Coomassie: Azul de Coomassie R250 0,5 g/200 ml; etanol al 90%; ácido acético al 10%.

10 Solución decolorante: etanol al 10%; ácido acético al 10%; glicerol al 3,5%.

Tampón de transferencia: Tris-base 20 mM; glicina 150 mM; metanol al 20% (v/v)

15 TBS: Tris-base 2,42 g/l; NaCl 8 g/l; ajustado a pH 7,6.

TRS-T: TBS + 0,1%, Tween 20.

Leche desnatada.

20

6) Métodos

6.1) Métodos de fisiología vegetal

25 6.1.1) Condiciones de cultivo

➤ Cultivo en tierra

30 Los cultivos en tierra se realizaron en una mezcla de mantillo hortícola y de vermiculita, esterilizada mediante un autoclavado a 125°C durante 20 minutos. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo, a 20-22°C, con luz continua.

➤ Cultivo *in vitro*

35

Para el cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron en una campana de flujo laminar, mediante incubación en un producto esterilizante (Domestos, Unilever) al 10% (v/v) en agua destilada estéril, durante 10 minutos. A continuación, se aclaran 5 veces en agua destilada estéril. Las semillas se ponen a geminar a continuación en placas de Petri (20 x 100 mm) que contienen medio con gelosa MS, con o sin antibiótico. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo, a 20-22°C, en días continuos.

40

6.2) Métodos de biología molecular

45 6.2.1) Manipulación del ADN

6.2.1.A) Métodos de extracción

➤ ADN plasmídico

50

El ADN bacteriano plasmídico se extrajo de acuerdo con un procedimiento de lisis alcalina y se purificó con ayuda de dos kits diferentes de acuerdo con la cantidad de plásmido requerida: el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” de Boehringer Mannheim se utilizó para realizar mini-preparaciones de plásmidos (aproximadamente 20 µg) a partir de 5 ml de cultivo saturado (*E. coli* cepa DH5α). Este kit utiliza una columna de sílice para retener el ADN. El kit “Wizard™ Plus Midiprep DNA Purification System” de Promega se utilizó para extraer mayores cantidades de plásmido (aproximadamente 100 µg para los plásmidos con gran número de copias) a partir de 50 ml de cultivo saturado (*E. coli* cepa DH5α). Este kit utiliza una columna de hidrocloreuro de guanidina para retener el ADN.

55

60 ➤ ADN genómico

Método Dellaporta: este método se empleó para extraer rápida y fácilmente muchos lotes de ADN genómico para la verificación por PCR de las plantas transgénicas. Este protocolo, descrito por Dellaporta (Dellaporta *et al.*, PMB, 1983, 1, 19-21), se adaptó a volúmenes más pequeños para realizarlo en tubos de 500 µl. Cada extracto se obtuvo a partir de 2 a 4 hojas (de acuerdo con su tamaño) de una misma planta de *Arabidopsis thaliana*.

65

ES 2 346 052 T3

6.2.1.b) Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)

➤ En el ADN plasmídico o genómico, después de la extracción:

5 Las reacciones se realizan en tubos de 500 μ l, en un volumen final de 25 μ l:

“mix”: mezcla de los siguientes constituyentes, preparada para todas las reacciones de PCR:

10 10 pmoles de cada uno de los dos oligonucleótidos específicos,

11 μ M de cada dNTP,

2,5 μ l de un tampón 10x, suministrado por la compañía que comercializa la polimerasa,

15 1,25 mM de MgCl₂ (o MgSO₄, de acuerdo con la enzima utilizada),

1 unidad de ADN-polimerasa termoestable,

20 ADN matriz (función de la polimerasa empleada y del tipo de de ADN matriz),

csp 25 μ l de agua desalada, desionizada y estéril.

Para las reacciones de PCR convencionales que no necesitan la obtención de un producto de secuencia estrictamente idéntica a la de la matriz, se utilizaron las polimerasas de ADN termoestables Dynazyme (Ozyme), Taq (Promega) y Tfl (Promega).

En este caso, 5 ng de ADN plasmídico o 200 ng de ADN genómico bastan para la realización del experimento.

30 Para obtener un fragmento amplificado cuya la secuencia es idéntica a la de la matriz, se utilizó la enzima de fidelidad Pfu (Stratagene). Esta enzima requiere una mayor cantidad de matriz: convencionalmente se utilizaron de 100 a 150 ng de plásmido, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En el caso de una matriz de ADN genómico, se utilizaron de 500 a 1000 ng.

35 Finalmente, cuando se esperaba un producto de PCR de tamaño superior a 2 kb, se seleccionó la PfuTurbo™ (Stratagene). Las cantidades de ADN matriz utilizadas son entonces de 10 ng para el ADN plasmídico y de aproximadamente 500 ng para el ADN genómico.

Las condiciones de reacción son:

40 Desnaturalización 93°C, 3 minutos

Desnaturalización 93°C, 1 minuto

45 Hibridación entre 48 y 55°C, 1 minuto

Elongación 72°C, variable**

Extensión final 72°C, 10 minutos

50 **variable de acuerdo con el par de cebadores

Tfl y PfuTurbo™: 1 minuto/kb a amplificar

55 Pfu: de 2 a 3 minutos/kb a amplificar

60 El número de ciclos de PCR está comprendido entre 30 y 40 para las reacciones que emplean Dynazyme (Ozyme), Taq (Promega) y Tfl (Promega). Para las reacciones realizadas con las enzimas de fidelidad, el número de ciclos es menor (hasta 25), para limitar los errores.

➤ En el ADN plasmídico contenido en células bacterianas:

65 La amplificación de una secuencia plasmídica puede realizarse directamente a partir de colonias bacterianas, esto para buscar las colonias que corresponden a las bacterias recombinantes (que hayan integrado efectivamente el plásmido que contiene el inserto de interés). El “mix” de PCR (misma composición que la que se ha dado anteriormente) se prepara y se distribuye por 25 μ l en varios tubos de 500 μ l. La enzima utilizada es Dynazyme (Ozyme), Taq (Promega) o Tfl (Promega).

ES 2 346 052 T3

Las colonias se extraen en la superficie del medio de cultivo sólido con ayuda de cualquier herramienta de extracción apropiada (cono, lupa, etc.), se transplantan a una nueva placa que contiene medio de cultivo LB sólido, y la herramienta de extracción se sumerge en el “mix” y se agita brevemente.

5 Las condiciones de PCR son las mismas que las que se han dado anteriormente.

En todos los casos, 10 μ l de producto de PCR a los que se añade 1 μ l de tampón de carga de ADN 10x, se depositan en un gel de agarosa (porcentaje de agarosa variable en función del tamaño del fragmento amplificado a observar, tampón TBE).

10

6.2.1.c) Métodos de clonación

15 La clonación molecular pasa por diferentes etapas entre las cuales el aislamiento del fragmento a clonar (después de la acción de una endonucleasa de restricción o no - caso de productos de PCR a clonar directamente en un vector de tipo “TA cloning” -), la apertura del vector de clonación (salvo en el caso de los vectores de tipo “TA cloning”), el ligamiento de estos dos elementos y la amplificación de la nueva construcción después de su introducción en una célula bacteriana.

20 ➤ Creación del plásmido recombinante:

- Hidrólisis mediante enzimas de restricción o digestión:

25 Las enzimas de restricción se utilizan en las condiciones recomendadas por los proveedores. El volumen de enzima utilizado corresponde, como máximo, al 10% del volumen final de la reacción de digestión.

- Desfosforilación de los extremos después de la digestión:

30 La estrategia de desfosforilación se utilizó cuando era necesario impedir que un vector digerido por una sola enzima de restricción se encierre sobre sí mismo. En este caso, se empleó la fosfatasa alcalina de Boehringer Mannheim de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- Purificación de los fragmentos de ADN

35 Las purificaciones de los fragmentos de ADN se realizaron de 3 formas diferentes según el caso:

Diálisis

40 Cuando se trataba únicamente de desalar el ADN (después de la acción de una endonucleasa de restricción, por ejemplo), según el caso y el volumen a tratar, se realizaron una simple membrana Millipore, una “*spin column*” (columna de centrifugado) (Sephadex G-50) o también una precipitación con etanol seguida de un lavado del sedimento obtenido con etanol al 70%.

45 *Fenol/cloroformo*

Cuando además de las sales, se mostraba necesaria una eliminación de las proteínas (enzima de restricción o fosfatasa alcalina), se realizó una purificación mediante la mezcla de fenol/cloroformo seguida de una precipitación con etanol.

50

A partir de un gel de agarosa

55 Para separar el fragmento de ADN de interés de otros fragmentos de ADN contaminantes, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (tampón TAE). El fragmento de interés se extrajo a continuación del gel gracias al kit “QIAQuick Gel Extraction Kit” de Qiagen o “Wizard™ PCR Prep” de Promega: el trozo de agarosa que contiene el ADN se hace líquido mediante calentamiento y después se pasa por una columna que fija el ADN. Después de una serie de lavados, el ADN se eluye con agua y, de este modo, puede utilizarse directamente para la clonación en un vector.

60

- Ligamiento del inserto y del vector:

65 Los ligamientos entre los fragmentos de ADN a integrar y los vectores de clonación a los sitios compatibles se realizan en presencia de una unidad de ADN ligasa del fago T4 (Promega o Boehringer Mannheim) preferiblemente a 16°C durante una noche o bien de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. La cantidad total de ADN utilizada está comprendida entre 200 ng y 500 ng, respetando una proporción molar entre el vector y el inserto de 1:3 a 1:5, en un volumen final de 10 a 20 μ l, correspondiente a las condiciones recomendadas por el proveedor.

ES 2 346 052 T3

- Ligamiento de un adaptador

Los oligonucleótidos se seleccionan para que se emparejen dejando los extremos cohesivos deseados. Los oligonucleótidos se hibridan a 1 pmol/ μ l en 10 μ l de tampón tfl 1X. Se incuban 1 minuto a 95°C y después 10 minutos a 45°C. A continuación 20 ng de oligonucleótidos (en un volumen máximo de 2 μ l) y 100 ng de vector se introducen en la reacción de ligamiento.

➤ *Caso particular de la clonación directa de un producto de PCR*

En el caso particular de la clonación directa de un producto obtenido mediante PCR, se utilizan las enzimas Dynazyme (Ozyme), Taq (Promega) o Tfl (Promega) que tienen la particularidad de añadir cada cierto tiempo una adenosina a los extremos 3' del ADN de cadena doble. Se han desarrollado sistemas de ligamiento que aprovechan esta particularidad: se trata de los sistemas pMOSBlue® (Amersham), pGEM®-T y pGEM®-T easy (Promega), que emplean un vector digerido por la enzima *EcoRV*, que genera bordes limpios y añade una timidina a los extremos 3' de los vectores. La unión entre el producto de PCR, purificado a partir de un gel de agarosa, y el vector utiliza de este modo el principio llamado de "TA cloning". La reacción de ligamiento se realiza en 10 μ l, con la ligasa suministrada en el kit y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cuando se requería la utilización de las enzimas de fidelidad Pfu o PfuTurbo™ (Stratagene) - que no añaden adenosina a los extremos 3' del ADN amplificado, se empleaba la técnica de "A-tailing": ésta consiste en extraer 3 μ l del producto de PCR obtenido, en añadirle 1 μ l de tampón 10x, 1 μ l de MgSO₄ a 25 mM, 1 μ l de dATP a 2 mM, 1 μ l de Tfl (a 5 unidades/ μ l) y 3 μ l de agua desalada, desionizada y estéril. El conjunto se incubaba 30 minutos a 70°C y después se dializa 1 hora a temperatura ambiente contra agua desalada, desionizada y estéril. El fragmento preparado de este modo está listo para un empleo directo para la reacción de ligamiento en un vector "TA cloning".

➤ *Preparación y transformación de bacterias competentes*

Los plásmidos se integran mediante choque térmico según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., 1989).

Las bacterias recombinantes se detectan entonces mediante amplificación por PCR por medio de cebadores presentes en el vector y/o el inserto, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente.

6.2.1.d) *Secuenciación*

Las reacciones de secuencia se realizaron mediante el método de terminación de extensión de la cadena (Sanger *et al.*, PNAS, 74, 5463-5467, 1977) en presencia de didesoxinucleótidos, cada uno marcado con un fluorocromo diferente (PRISM Read Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit, Applied Biosystems). Cada reacción necesita 250 ng de ADN matriz de cadena doble y 5 pmoles de cebador en un volumen final de 10 μ l que contiene 4 μ l de la mezcla Dye deoxy Terminator diluida 4 veces. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis utilizando un secuenciador AB1377A.

6.2.1.e) *Hibridación de tipo transferencia de Southern*

➤ *Preparación de las sondas radiactivas*

Las sondas utilizadas en los experimentos de hibridación de tipo transferencia de Southern se marcaron con fósforo 32 (³²P) mediante la técnica de PCR: ésta consiste en incorporar α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol). El marcado mediante PCR se realiza de la siguiente manera: la mezcla de reacción, con un volumen final de 25 μ l, contiene 2 ng del plásmido que contiene la sonda, 2 pmoles de cada cebador específico, 50 μ Ci de α -³²P-dCTP, 3,6 μ M de dCTP frío, 60 μ M de los otros dNTP fríos y 1 μ l de Tfl (a 5 unidades/ μ l). Las reacciones de PCR se realizan como se ha descrito anteriormente y comprenden de 20 a 25 ciclos.

La calidad de las sondas obtenidas se ensaya en gel de agarosa transferido a una membrana de nylon y expuesta 2 minutos sobre una película radiográfica.

La sonda radiactiva se purifica a continuación en una columna con ayuda del sistema MicroSpin7m G25 Columns (Amersham) antes de utilizarla.

ES 2 346 052 T3

6.2.2) Manipulación del ARN

6.2.2.a) Método de extracción

5 Los ARN totales se extrajeron a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* con ayuda del tampón de extracción REB y de acuerdo con el protocolo de Kay *et al.* (Science, 236, 1299-1302, 1987). Los ARN polyA+ se obtienen con ayuda de un kit polyAtract (Promega) de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

10 6.2.2.b) Hibridación de ARN: transferencia de Northern

➤ Preparación de las sondas radiactivas

15 32 Las sondas utilizadas en los experimentos de hibridación de tipo transferencia de Northern se marcaron con fósforo mediante la técnica de PCR como se ha descrito anteriormente.

➤ Gel, transferencia en membrana e hibridación

20 Hasta 50 μg de ARN totales, en un volumen de 4,5 μl , se añadieron a 15,5 μl de tampón de carga, y después se desnaturalizaron 5 minutos a 65°C. Se depositaron en un gel de agarosa al 1% (tampón MOPS 1x, formaldehído 2,2 M) y se separaron mediante electroforesis en tampón MOPS 1x (5 minutos a 125 V, y después 2 h 30 minutos a 75 V). Los ARN se tiñeron con bromuro de etidio, para asegurarse de una carga homogénea entre las diferentes pistas. Después de dos pases de 15 minutos del gel en el tampón de lavado, los ARN se transfirieron durante una noche a membranas de nylon (membranas Hybond N+, Amersham) por capilaridad (Sambrook *et al.*, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., 1989) en presencia de una solución de SSC 20x. Los ARN se fijaron a las membranas mediante una incubación de 2 horas a 80°C. La pre-hibridación se realizó en 25 ml o 50 ml (según el tamaño de las membranas) de tampón de hibridación que contiene 20 mg/l de ADN de timo de ternera desnaturalizado. Después de un periodo de 30 minutos a 2 h de prehibridación a 65°C, la sonda de ADN desnaturalizada se añade al tampón para una incubación de 16 h a 65°C. Las membranas se lavan a continuación 2 veces durante 20 minutos a 65°C con el tampón de lavado I. A continuación se realiza un último lavado a 65°C durante 10 minutos máximo con el tampón II. Las señales de hibridación se detectaron mediante exposición de película BIOMAXTm (Kodak) o mediante análisis de imágenes en Phosphorimager (Storm 640, Molecular Dynamics). Para hibridaciones sucesivas, las membranas se deshibridaron de acuerdo con las recomendaciones que se dan en el manual de Amersham.

35

6.2.2.c) Método de RT-PCR

40 El enfoque de PCR mediante transcripción inversa se utilizó en este trabajo, para buscar, en las silicuas jóvenes, transcritos correspondientes a la región de ADN etiquetada. El método se divide en 2 etapas sucesivas: la obtención de ADN complementarios (ADNc) a partir de ARN totales, y a continuación la reacción de PCR propiamente dicha, a partir de estos ADNc.

45 ➤ Obtención de ADNc

La reacción de transcripción inversa se realizó con ayuda del kit ProSTARTulirst-Strand RT-PCR Kit (Stratagene), a partir de ARN totales tratados con ADNasa 1 (para limitar las contaminaciones de los futuros ADNc por el ADN genómico. El kit utiliza la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MuMLV) y un cebador oligodT.

50

➤ PCR en los ADNc

55 Los productos de la transcripción inversa se utilizan como matriz para la PCR. Las condiciones son las mismas que las descritas anteriormente (véase el párrafo relativo a la PCR). La única diferencia se basa en el volumen final de reacción (50 μl) y el número de ciclos, más elevado (30 a 45 ciclos, según el caso).

60

65

ES 2 346 052 T3

Ejemplo 2

Demostración de la presencia de un transcrito SUP25

5 1) *Demostración de la presencia del mensajero correspondiente a la proteína SUP25*

1.1) *Extracción de los ARN de Arabidopsis thaliana*

10 Los ARN totales se extrajeron a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* con ayuda del tampón de extracción REB y de acuerdo con el protocolo de Kay *et al.* (Science, 1987, 239: 1299-1302). Los ARN polyA+ se obtienen utilizando el kit polyAtract (Promega), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

15 1.2) *Hibridación de tipo Northern*

Las técnicas convencionales de hibridación de tipo Northern no permitían nunca demostrar la presencia del mensajero correspondiente a la proteína SUP25 en extractos de silicuas inmaduras de *Arabidopsis thaliana* (Varoquaux, tesis, Universidad de Perpignan, Francia, 2000).

20 El nivel de expresión del gen nativo correspondiente aparece por lo tanto por debajo del umbral de detección de la técnica.

Para aumentar la sensibilidad del experimento, la expresión del gen se analizó mediante la técnica de Northern en gel de poliacrilamida con extractos de ARN polyA⁺. No se pudo observar ninguna señal de hibridación en los extractos de 4 µg lo que indicaba la ausencia o la expresión muy reducida del gen.

30 1.3) *Reacción de polimerización en cadena por transcripción inversa (RT-PCR)*

Para buscar una señal en las silicuas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*., se utiliza la técnica de la transcripción inversa RT-PCR.

El experimento se realiza en 2 etapas: se realiza una transcripción inversa de los ARN totales de las silicuas, seguida de una PCR en los ADNc polyA+ obtenidos de este modo.

35

1.3.a) *Obtención de ADN complementarios (ADNc)*

40 Se realizó la reacción de transcripción inversa con ayuda del kit ProSTARTulirst-Strand RT-PCR Kit (Stratagene), a partir de 10 µg de ARN totales tratados con ADNasa I (para limitar la contaminación de los futuros ADNc por ADN genómico). El kit utiliza la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MuMLV) y un cebador oligoDT.

45 1.3.b) *PCR en los ADNc*

Los 2 pares de cebadores seleccionados (05, Pend3) y (15, Pend3) se presentan en la figura 1A.

50 La amplificación en el ADN genómico (figura 1B, pistas ADNg 05 y 15) permite verificar el tamaño de los productos de reacción y apreciar la calidad de amplificación. Los productos de amplificación realizados con ayuda de estos 2 pares deben permitir demostrar la presencia de 2 fragmentos respectivamente de 0,23 kb (par 15, Pend3) y de 0,81 kb (par 05, Pend3).

55 La amplificación de un gen de actina 2 ubicuo (pistas A), permite controlar el nivel de amplificación de los ARN y evaluar la contaminación de ADN genómico por la presencia de un intrón entre los 2 cebadores utilizados.

2,5 µl de producto de la transcripción inversa (α) se utilizan como matriz para la PCR. Las condiciones son las mismas que las descritas anteriormente (véase el párrafo relativo a la PCR). La única diferencia se basa en el volumen final de reacción (50 µl) y el número de ciclos, más elevado (30 a 45 ciclos según el caso).

60

Los productos obtenidos de la reacción de PCR se someten a continuación a una hibridación de acuerdo con Southern después de electroforesis en gel de agarosa, con una sonda de PCR radiactiva correspondiente a la región del péptido (figura 1A) Los resultados de esta hibridación se presentan en la figura 1C.

65 El transcrito de actina muestra que el nivel de ARN es muy inferior en el extracto de silicuas con respecto al extracto de plántulas (figura 1B).

ES 2 346 052 T3

La flecha 3 (figura 1C) revela la presencia del producto de amplificación con el tamaño predicho de 0,23 kb lo que indica la presencia del transcrito en extractos de ARN polyA+ de silicuas inmaduras; la flecha 4 muestra una señal despreciable al tamaño esperado de 0,81 kb. La contaminación del extracto por el ADN genómico es, por lo tanto, muy reducida.

5

El transcrito de 0,23 kb está presente en los extractos de silicuas inmaduras (0 a 5 días después de la fecundación), así como en las plántulas a un nivel más reducido (figura 1C, flecha 2), si se compara con la actina.

Se observa la presencia de una banda artificial en la figura 4B (flecha 1); este producto de amplificación se clonó y después se secuenció y no contiene ninguna homología con el gen de la invención, esta banda está, por lo demás, ausente del perfil de hibridación (figura 1 C).

10

La secuenciación del producto de 0,23 kb (transcrito SUP25) reveló una secuencia de 227 pares de bases presentada en la figura 1D.

15

2.) *Demostración de la presencia de ATG funcionales en el transcrito*

El análisis de la secuencia amplificada por RT-PCR del transcrito SUP25 muestra la existencia de codones de iniciación (ATG) entre los cuales de tres marcos de lectura abiertos (ORF).

20

La secuencia de aminoácidos deducida del mayor marco de lectura abierto corresponde a un péptido de 25 aminoácidos (SUP 25).

Para demostrar la aptitud de la maquinaria de traducción para iniciar la síntesis proteica en los ATG, se realizó un experimento de expresión transitoria. La “*Green Fluorescent Protein*” (Proteína Verde Fluorescente) (GFP) (plásmido PRTL2- EGFP) desprovista de su codón de iniciación se clona en fusión traduccional con los diferentes ATG (figura 2A, 0 atg: son ATG, 1 atg: 1 ATG, y así sucesivamente). Cada construcción clonada de este modo se co-transfecta a la epidermis de cebolla con el plásmido pRTL2-GUS (Restrepo A, Freed DD., Carrington JC, Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell.* octubre de 1990; 2 (10): 987-98) a proporción molar constante, permitiendo de este modo disponer de un control interno. En cada muestra, la sub-población de células que expresan la GFP se cuenta y después se relaciona con la sub-población que expresa la proteína GUS, cada proporción de manchas evaluada de este modo refleja el nivel de expresión del gen informador (figura 2B). Una primera construcción sin ATG permite verificar, en un control negativo, que la GFP sin ATG no se traduce, no se contó ninguna células que exprese GFP. Para las otras tres fusiones traduccionales, el nivel de expresión de la GFP es prácticamente el mismo, lo que indicaba de este modo el carácter funcional de los 3 ATG. La presencia de los marcos de lectura de pequeño tamaño cadena arriba de la secuencia codificante no afecta al nivel de expresión de la GFP. Esto indica que los codones de terminación de los marcos de lectura de pequeño tamaño no imponen la detención del complejo ribosómico que es entonces capaz de reiniciar la traducción cadena abajo en el transcrito. En otras palabras, el resultado de este experimento demuestra sin ambigüedad que la traducción puede iniciarse o re-iniciarse en el tercer ATG del locus. Este resultado permite de este modo apoyar la hipótesis relativa a la existencia del péptido.

25

30

35

40

Ejemplo 3

45

Inmunoelectrotransferencias

3.1) *Preparación de anticuerpos contra el péptido*

Los péptidos fueron sintetizados por la compañía Eurogentec. Los anticuerpos fueron producidos en el péptido sintético truncado (sup 16) por la compañía Eurogentec.

50

3.2) *Extracción de proteínas de silicuas*

55

Las proteínas se extrajeron mediante trituración de las silicuas en el tampón de extracción para inmunoelectrotransferencias, con ayuda de mini-punzones (Kontes) unidos a un triturador RZE2021 (Heidolph). Después del centrifugado (20 minutos a 10000 g), la concentración proteica del sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford con ayuda del reactivo comercializado por la compañía Bio-Rad.

60

3.3) *Análisis electroforéticos*

Las electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizaron de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). El gel de concentración es al 3% de una mezcla de acrilamida/bis acrilamida (30%/0,8%) y el gel de separación es al 18% de la mezcla ProSieve. 15 µg de proteínas totales a las que se añade el tampón de carga a la concentración final de 1 x, se llevan a 100°C durante 3 minutos y después se depositan en cada pista.

65

ES 2 346 052 T3

Las proteínas se separan mediante una corriente constante de 15 a 20 mA por gel, durante aproximadamente 1 hora. Los geles que no se destinan a las inmunoelectrotransferencias se tiñen con Azul de Coomassie durante 30 minutos y después se decoloran hasta la aparición de las bandas correspondientes a las proteínas.

5 3.4) Inmunoelectrotransferencias

Para las inmunoelectrotransferencias, las proteínas se transfirieron después de la migración en gel, a membranas de nitrocelulosa (Pure Nitrocellulose membrane, 0,1 μm , Protan) en una cubeta de electrotransferencia semi-seca Temblot 10 Ae-6675 (Touzart y Matignon) durante 40 minutos a 2,5 mA.cm².

Las reacciones de marcado se realizaron a 37°C con agitación moderada.

Las membranas se incuban durante 1 hora en 100 ml de TBS-T que contiene el 5% de gelatina, y después se lavan 15 con TBS-T (tres veces 15 minutos). Las membranas se incuban a continuación por separado en presencia de 20 ml de TBS-T con la adición de leche desnatada al 1,2% y de 2 μl del 1^{er} anticuerpo (suero que reconoce a Sup 16) durante 2 horas. A continuación, se lavan las membranas en 200 ml de TBS-T (tres veces 15 minutos), y después se incuban durante 1 hora en 20 ml de TBS-T que contiene el 1,2% de leche desnatada y 1 μl del segundo anticuerpo (anticuerpo 20 de cabra anti-IgG de conejo acoplado a una peroxidada de rábano, Bio-Rad). Las membranas se lavan a continuación en 200 ml de TBS-T (tres veces 15 minutos).

La revelación se realiza por medio del kit ECL “Western Blotting Detection Reagents” (Amersham), según las condiciones recomendadas por el proveedor.

25 Ejemplo 4

Actividad anti-microbiana del péptido

30 Se realizaron experimentos de toxicidad del péptido de 25 aminoácidos (SUP 25) purificado en el ejemplo anterior en diferentes bacterias.

Las diferentes bacterias se cultivan en 5 ml de medio LB o de medio apropiado para la cepa, y después se sedimentan mediante centrifugado a 3000 g, y finalmente se resuspenden en un volumen de LB idéntico al volumen de 35 bacterias. Se inoculan 50 μl de bacterias en 9 ml de TOPagar (LB + 7 g/l de bactoagar) líquido a 48°C y se vierten rápidamente en una placa de LB agar cuadrada de 10 cm de lado. Las gotas de 10 μl de diferentes concentraciones de péptidos se depositan sobre el TOPagar solidificado. La placa se cultiva durante 16 horas.

40 La cecropina A a 20 μM , péptido de insecto reconocido por tener actividad antibacteriana, sirve como control positivo.

Resultados

Bacterias	Patógeno de plantas	Actividad bacteriostática	Molaridad activa	Cecropina A 20 μM
45 <i>Escherichia coli</i> Cepa DH5 α	No	Negativo	-	Positivo
50 <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> cepa 8004	Si	Positivo	200 μM	Positivo
55 <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> cepa DC3000	Si	Positivo	20 μM	Positivo
60 <i>Erwinia amylovora</i> Cepa 1430	Si	Positivo	25 μM	No ensayado

65 El péptido de 25 aminoácidos no presenta actividad sobre *Escherichia coli*, pero presenta una actividad sobre *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia amylovora*, lo que permite imaginar su utilización como agente anti-microbiano particularmente dirigido contra los agentes patógenos de plantas muy particularmente al menos contra *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y/o *Erwinia amylovora*.

ES 2 346 052 T3

Ejemplo 5

Efecto citotóxico del péptido SUP 25 sobre los protoplastos de Arabidopsis thaliana

5 Ensayos de toxicidad realizados sobre células vegetales, aisladas, sin pared, revelan una pérdida de viabilidad inducida por la adición de péptidos sintéticos al medio de cultivo. Algunas mutaciones de la secuencia de aminoácidos del péptido suprimen la toxicidad.

10 5.1) *Medición de la viabilidad mediante la tinción con DiAcetato de Fluoresceína (FDA)*

Los ensayos de viabilidad mediante tinción con FDA se basan en la detección de la actividad esterasa específicamente presente en las células vivas. El FDA penetra en la célula, los restos de acetato son cortados por la actividad esterasa y se libera la fluoresceína, otorgando a las células vivas una coloración verde con excitación azul. En cuanto a las células muertas, cuando son clorofílicas, presentan fluorescencia roja gracias a los pigmentos que contienen.

Se obtienen protoplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana* y se cultivan de acuerdo con el método descrito por Danon y Gallois (FEBS letters, 1998, 437: 131-136).

20 El péptido sintético de 25 aminoácidos (SUP25) se añade a los protoplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana* en cultivo.

Una dosis de 10 μM de SUP25 basta para rebajar en un factor 2,5 la viabilidad de una población de células. (Figura 3).

25 Por el contrario, el péptido truncado de 16 aminoácidos (pep 16) a 10 μM solamente afecta al índice de protoplastos vivos en un factor 1,3.

Debido a la gran hidrofobicidad del péptido de 16 aminoácidos, éste se utilizó en DiMetilFormamida (DMF) al 30 50%. El control de DMF en solitario afecta a la viabilidad en un factor 1,2. Lo que permite afirmar que el efecto del péptido truncado sobre la viabilidad de los protoplastos es muy reducido, incluso nulo, en comparación con el efecto del péptido completo.

35 Por lo tanto, puede concluirse que la toxicidad del péptido está vinculada específicamente a los 10 aminoácidos de la región C-terminal del péptido SUP25.

Por otro lado, la dosis implicada en el efecto corresponde a los órdenes de magnitud de las dosis letales (de 1 a 100 μM) de diferentes péptidos anti-microbianos conocidos (Bulet P., Med. & Sc., 1999, 1, 23-9).

40 5.2) *Determinación de la concentración óptima para la actividad citotóxica del péptido*

Se aplicaron diferentes concentraciones del péptido SUP25 (1 μM , 5 μM , 10 μM y 100 μM) sobre los protoplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 4). A primera vista, la actividad del péptido no depende de la dosis, aunque se observa un efecto óptimo a 5 μM . Debido al procedimiento experimental y para no añadir volúmenes demasiado grandes a los protoplastos, el experimento se realizó utilizando cuatro soluciones madre a las concentraciones de 1 mM, 5 mM, 10 mM y 100 mM, respectivamente.

50 Para controlar la homogeneidad de las soluciones madre, se depositó una fracción alícuota, del mismo volumen para cada solución de péptido, sobre gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Figura 4, encarte). A alta concentración, el péptido está implicado en la formación de complejos multiméricos superiores a 30 kDa. La estabilidad de estos complejos sugiere la intervención de las cisteínas en la formación de puentes disulfuro, los únicos capaces de resistir al tratamiento con SDS.

55 Este experimento muestra que la forma monomérica del péptido es la más eficaz y que una concentración de 5 μM del péptido conduce a una caída de viabilidad muy significativa.

60 5.3) *Medición de la fragmentación del ADN después de los tratamientos con diferentes péptidos modificados*

Este experimento tiene como objetivo determinar si el efecto del péptido sobre la viabilidad de los protoplastos de *Arabidopsis thaliana* corresponde a la de la necrosis celular o bien a la implementación de la vía de muerte celular programada o apoptosis.

65 La apoptosis se distingue de la necrosis por una puesta en escena rigurosa de la muerte, acentuada por un conjunto de eventos genéticos controlados (Vaux y Korsmeyer (Cell, 1999, 96: 245-254); Pennell y Lamb (Plant Cell, 1997, 9: 1157-1168); Greenberg (P.N.A.S., 1996, 93:12094-12097)). Una de estas etapas es la fragmentación del ADN nuclear que puede demostrarse mediante la técnica TUNEL ("Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP

Nick End Labeling”) de acuerdo con el protocolo de Negoescu (Negoescu *et al.*, Plant J., 1997, 13: 803-814). La reacción de TUNEL permite marcar los extremos 3’OH libres presentes en gran cantidad en los núcleos cuyo ADN se fragmentó en el transcurso del proceso de apoptosis. La figura 5 presenta los resultados de marcado TUNEL sobre protoplastos sometidos a diferentes variantes del péptido.

La aplicación externa del péptido de 25 aminoácidos sobre protoplastos de *Arabidopsis thaliana* a 5 µM durante 2 horas permite observar un aumento de la población de protoplastos TUNEL positivos (figura 5B). 4 veces más núcleos presentan características de fragmentación de ADN con respecto al control. El péptido truncado de 16 aminoácidos (pep16) no induce ningún efecto.

5.4) Estudio de la actividad biológica de péptidos modificados a nivel de las cisteínas

5.4.1) Construcción y síntesis de los péptidos modificados:

Para estudiar el impacto de las cisteínas sobre la actividad biológica observada, los 3 péptidos modificados pepDs, Pep1S y Pep2S (Figura 5A) fueron sintetizados por la compañía Eurogenetec.

5.4.2) Actividad citotóxica de los péptidos modificados:

La fragmentación del ADN nuclear inducida por estos péptidos modificados se demuestra mediante la técnica TUNEL (figura 5B).

pepDs presenta un actividad residual.

pep1S ya no presenta actividad citotóxica.

Pep2S presenta una actividad citotóxica.

Este resultado sugiere que las cisteínas están implicadas en la formación de un puente disulfuro intramolecular, permitiendo de este modo que el péptido permanezca libre y activo.

Ejemplo 6

Obtención de plantas transgénicas que expresan el péptido SUP25

La secuencia del gen *SUP25* puede introducirse en una casete de expresión utilizando diversos promotores para controlar, a nivel transcripcional, la producción del péptido en diferentes tipos de células vegetales.

6.1) Síntesis de la secuencia del gen

Debido al pequeño tamaño del ORF, puede sintetizarse la secuencia que codifica el péptido SUP25. Un par de oligonucleótidos sentido y antisentido correspondiente a la secuencia del péptido se sintetiza por encargo. La secuencia se diseña de manera que la hibridación del par de oligonucleótidos deje extremos cohesivos correspondientes a sitios de restricciones *Bam*HI en 5’ y *Pst*I en 3’ del fragmento de ADN. Los sitios *Bam*HI/*Pst*I permiten clonar el gen en la casete de expresión del plásmido pDH51 (Pietrzak M. *et al.*, Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acids Res. 1986,14(14): 5857-68) en el que el promotor CaMV 35S y la región 3’ del 35S dirigen la expresión del gen introducido.

Sec N° 1: (SEC ID N° 28)

gatcATGTGGTGGCTAGTTGGACTIONACACCAGTTGAGTTGATCCATCTTTGCGCATTTCGAGAGCGTCTCTGT
CATCTCTAAtgca

Sec N° 2: (SEC ID N° 29)

TTAGAGATGACAGAGACGCTCTCGAAATGCGCAAAGATGGATCAACTCAACTGGTGTAAGTCCAAGTCAACTAGCC
ACCACAT

ES 2 346 052 T3

6.2) Ligamiento de la secuencia del péptido en una casete de expresión

Los oligonucleótidos se hibridan a 1 pmol/ μ l en 10 μ l de tampón tfl 1X (Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed. CSHLP, 2001) y se incuban 1 minuto a 95°C y después 10 minutos a 45°C. A continuación, se ligan 20 ng de oligonucleótidos (2 μ l) en 100 ng de vector pDH51 utilizando los sitios BamHI/PstI (Sambrook *et al.*, 2001). El producto de ligamiento se transforma en *E. coli* XL1-B (Stratagene) utilizando un método químico (Sambrook *et al.*, 2001). Los transformantes se seleccionan en el antibiótico ampicilina. La presencia del inserto puede identificarse directamente en los transformantes mediante ausencia color azul en medio que contiene el sustrato X-GAL (Sambrook *et al.*, 2001). Se utilizan cinco transformantes independientes para extraer el plásmido con el kit comercial High pure plasmid Isolation kit (Roche/Boehringer). La presencia del inserto se verifica mediante restricción con la enzima *EcoRI* (Sambrook *et al.*, 2001). La fidelidad de secuencia de las construcciones se verifica por la presencia de la secuencia SUP25 mediante secuenciación (Sambrook *et al.*, 2001) utilizando un cebador que aparea el promotor 35S [op35S52: CTTCGTCAACATGGTGGAGC]: (SEC ID N° 30) o el terminador 35IS [oter35: CTAGCTAGAGGATCGATCC]: (SEC ID N° 31).

6.3) Transferencia del transgén en un vector binario de transformación

El transgén se sub-clona a continuación en el sitio *EcoRI* de la región T-DNA del plásmido binario pZP111 (Hajdukiewicz P, *et al.*, The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol., 1994, (6): 989-94.), que comprende un gen de selección *NPTII* que otorga a las plantas una resistencia al antibiótico kanamicina. El plásmido contiene también un gen de selección *aadA* para la selección con cloranfenicol en *E. coli* o *Agrobacterium*. El producto de ligamiento se transforma en *E. coli* XL1-B (Stratagene) utilizando un método químico (Sambrook *et al.*, 2001). Los transformantes se seleccionan en medio LB (Sambrook *et al.*, 2001) + 25 mg/l de cloranfenicol. La presencia del inserto en el plásmido pZP111 puede identificarse directamente en los transformantes bacterianos mediante la ausencia de color azul en medio que contiene el sustrato X-GAL (Sambrook *et al.*, 2001).

6.4) Transferencia del vector binario en *Agrobacterium*

Se selecciona una cepa positiva, el plásmido se purifica utilizando el kit comercial High pure plasmid Isolation kit (Roche/Boehringer). La cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Koncz C. y Schell, J., The promoter of TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector, Mol. Gen. Genet., 204: 383-396) se hace competente y a continuación se transforma mediante electroporación (Shen WJ. y Forde BG., Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 1989, 17(20): 8385) con el plásmido binario que contiene la construcción de ADN-T. Después de 3 días de cultivo a 28°C, las colonias resistentes al cloranfenicol 25 mg/l, Rifampicina 50 mg/l, Gentamicina 25 mg/l, se confirman como positivas mediante PCR utilizando cebadores que detectan el promotor 35S [op35S52: CTTCGT CAACATGGTGGAGC] (SEC ID N° 30) y el terminador 35IS [oter35: CTAGCTAGAGGATCGATCC] (SEC ID N° 31) (Sambrook *et al.* 2001).

6.5) Obtención de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas se obtienen a continuación mediante agroinfección utilizando la cepa C58C1 (Koncz y Schell, 1986) y el método de transformación de botones florales de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo con el protocolo descrito por Bechtold, N. *et al.*, (En planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, C.R. Acad. Sci. (1993) París, 316, 1194). En resumen, un precultivo de 10 ml de YEP (extracto de levadura 10 g/l; peptona 10 g/l; glucosa 20 g/l; kanamicina 50 mg/l; rifampicina 50 mg/l; gentamicina 25 mg/l se inocula con una colonia de *Agrobacterium*. Después de 16 h en agitación a 28°C, se siembran 500 ml de YEP. Cuando el cultivo alcanza una DO₆₀₀ = 0,8, las bacterias se recogen después del centrifugado a 3000 g y se ponen en solución en el medio de infiltración (medio MS 2,16 g/l (Duchefa); MES (Sigma) 0,5 g/l; sacarosa al 5%; pH 5,7 ajustado con KOH; Silwet L-77 (Osi Specialises Ins.) al 0,02%) a una DO final de 0,5.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana*, en el estadio en el que las astas florales comienzan a iniciar las primeras flores, se sumergen en la solución de infiltración durante 10 minutos al vacío (-1 atm) en un secador. Las plantas se riegan a continuación por goteo y después se cultivan hasta la recogida de las semillas con los 2 primeros días de cultivo bajo una película plástica. Las semillas se recogen 4 semanas después de la infiltración. Después de un mínimo de 15 días de almacenamiento, las semillas se esterilizan con una solución de etanol al 70%, 10 minutos y después se seleccionan *in vitro* en medio de germinación Gamborg B5 (Duchefa) 1,85 g/l y Phytigel (Sigma) 3 g/l que contiene 400 mg/l del antibiótico kanamicina cuya resistencia es portada por el ADN-T. Las plantas resistentes (aproximadamente el 1% de las semillas) se transplantan en tierra, se conservan en plástico durante 4 días y se cultivan hasta la recogida de las semillas.

El análisis del número de loci de inserción del transgén se realiza mediante un test estadístico de la segregación mendeliana del gen de selección, en este caso para kanamicina, *in vitro* en medio de germinación Gamborg B5 (Duchefa) 1,85 g/l y Phytigel (Sigma) 3 g/l que contiene 400 mg/l del antibiótico kanamicina. Se seleccionan diez

ES 2 346 052 T3

plantas con un único locus de inserción (segregación 3:1) La presencia del transgén se confirma en aproximadamente 8 plantas de 10 mediante análisis por PCR de ADN purificado de las plantas mediante el método (Dellaporta *et al.*, Plant. Mol Biol. Rept., 1983, 1, 19-21) y utilizando cebadores que detectan el promotor 35S [op35S52: CTTCGTCAA CATGGTGGAGC] (SEC ID N° 30) y el terminador 351S [oter35: CTAGCTAGAGGATCGATCC] (SEC ID N° 31).
5 La expresión del péptido se confirma mediante análisis de Western (Sambrook *et al.*, 2001) de extracto proteico de las plantas transgénicas utilizando un anticuerpo contra la secuencia total del péptido SUP25 silvestre y el kit de detección ECL (Amersham).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado, natural o sintético, **caracterizado** por que comprende al menos una secuencia seleccionada entre:

- las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 7, en las que el aminoácido en posición 16 es una cisteína o una serina, y
- las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que el aminoácido en posición 16 y el aminoácido en posición 23 son, independiente o simultáneamente, una cisteína o una serina.

2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que consiste en una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 10.

3. Péptido aislado, natural o sintético, **caracterizado** por que su secuencia presenta al menos el 60% de identidad con una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 1 a SEC ID N° 7, en las que el aminoácido en posición 16 es una cisteína o una serina, y SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que el aminoácido en posición 16 y el aminoácido en posición 23 son, independiente o simultáneamente, una cisteína o una serina, y por que conserva una actividad anti-microbiana.

4. Péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un grupo funcional libre, amino y/o carboxilo, está protegido por un grupo protector.

5. Péptido de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** por que el grupo carboxilo C-terminal y/o los demás grupos carboxilos presentes en la molécula están en forma de un éster o de una amida.

6. Péptido de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** por que el grupo amino N-terminal, y/o los demás grupos amino libres presentes en la molécula, están en forma acilada.

7. Composición que comprende al menos un péptido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6 y al menos un vehículo apropiado.

8. Utilización de al menos un péptido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de una composición anti-microbiana, dirigida contra los agentes patógenos de plantas.

9. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada** por que la composición anti-microbiana está dirigida contra *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* o *Erwinia amylovora*.

10. Utilización de al menos un péptido que comprende o que consiste en al menos una secuencia seleccionada entre:

- las secuencias SEC ID N° 2 a SEC ID N° 7, en las que el aminoácido en posición 16 es una cisteína o una serina, y
- las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que el aminoácido en posición 16 es una cisteína o una serina y el aminoácido en posición 23 es una cisteína,

para la preparación de una composición citotóxica, particularmente para las células vegetales.

11. Utilización de al menos un péptido que comprende o que consiste en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que los aminoácidos en las posiciones 16 y 23 son dos serinas, para la preparación de una composición citotóxica, particularmente de una composición citotóxica para las células vegetales.

12. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizada** por que dicha composición es una composición herbicida.

13. Utilización de al menos un péptido que comprende o que consiste en al menos una cualquiera de las secuencias SEC ID N° 8 a SEC ID N° 10, en las que el aminoácido en posición 16 es una cisteína y el aminoácido en posición 23 es una serina, para la preparación de una composición anti-microbiana no citotóxica, particularmente de una composición anti-microbiana no citotóxica dirigida contra los agentes patógenos de plantas.

14. Polinucleótido aislado, natural o sintético, **caracterizado** por que consiste en una secuencia que codifica al menos uno de los péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

ES 2 346 052 T3

15. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** por que consiste en una secuencia seleccionada entre:

- las secuencias SEC ID N° 11 a SEC ID N° 17, en las que el triplete de nucleótidos 46 a 48 forma un codón cisteína o un codón serina, y
- las secuencias SEC ID N° 18 a SEC ID N° 20, en las que el triplete de nucleótidos 46 a 48 y el triplete de nucleótidos 67 a 69 forman un codón cisteína o un codón serina.

16. Composición que comprende al menos un polinucleótido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 y al menos un vehículo apropiado.

17. Vector que comprende al menos uno cualquiera de los polinucleótidos descritos en las reivindicaciones 14 ó 15.

18. Vector de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado** por que se trata de un vector plasmídico.

19. Utilización de un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 o de un vector tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, para la preparación de un péptido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

20. Sistema biológico modificado, **caracterizado** por que está constituido por un microorganismo, un endofito, una levadura o una célula eucariota y por que contiene al menos uno de los vectores tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, y/o al menos uno de los polinucleótidos tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15.

21. Composición que comprende al menos un sistema biológico tal como se describe en la reivindicación 20 y al menos un vehículo apropiado.

22. Utilización de al menos un sistema biológico tal como se describe en la reivindicación 20 o de una composición tal como se describe en la reivindicación 21, para la preparación de una composición anti-microbiana, particularmente de una composición anti-microbiana dirigida contra los agentes patógenos de plantas y/o para la preparación de una composición citotóxica.

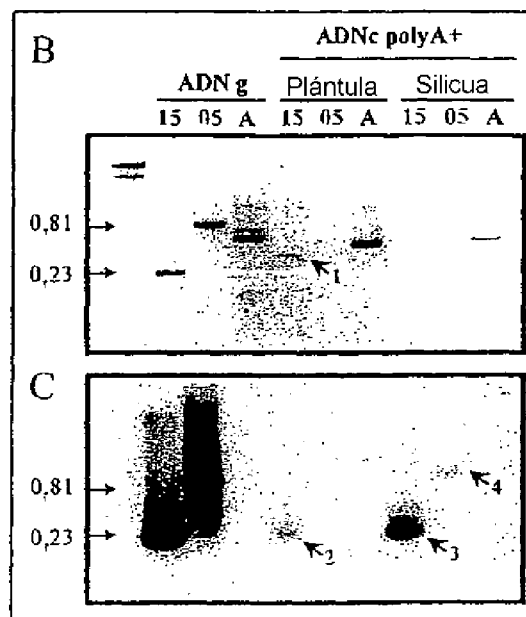
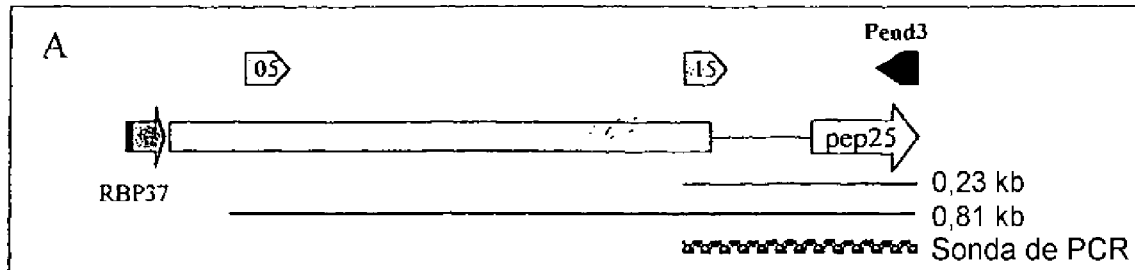
23. Utilización de al menos un polinucleótido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, o de al menos un vector tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, en la preparación de un sistema biológico modificado constituido por un microorganismo, un endofito, una levadura o una célula eucariota.

24. Organismo transgénico no humano, **caracterizado** por que todas o parte de sus células contienen al menos un polinucleótido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, o al menos un vector tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18.

25. Organismo transgénico de acuerdo con la reivindicación 24, **caracterizado** por que se trata de un vegetal.

26. Anticuerpo, policlonal o monoclonal, dirigido contra al menos uno de los péptidos tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

27. Procedimiento de tratamiento anti-microbiano y/o citotóxico de vegetales, en el que se pone en contacto mediante cualquier medio apropiado un organismo, particularmente un vegetal, y al menos un agente anti-microbiano, y/o citotóxico seleccionado entre al menos uno de los péptidos tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y/o uno de los vectores tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, y/o los polinucleótidos tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, y/o uno de los sistemas biológicos modificados tales como se describen en la reivindicación 20 y/o un organismo transgénico, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25 o las composiciones tales como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 7, 16 ó 21.



D

```

001 ATCAGTCAGA CAGTCAAATT CTTGAATTGG TCAATGTTAA
041 ATTTTAAATT ATCATGACAA GTAACCTTGC TCAGTTGTAT
081 TTTTAATCGA ATGGTAAATA AACTTTAAAG GATGAAATTG
121 TAATTTGCAA GTATCACACG TCAAGCGTAT GTGGTGGCTA
161 GTTGGACTTA CACCAGTTGA GTTGATCCAT CTTTGGCCAT
201 TTCGAGAGCG TCTCTGTCAT CTCTAAGTA
    
```

Figura 1

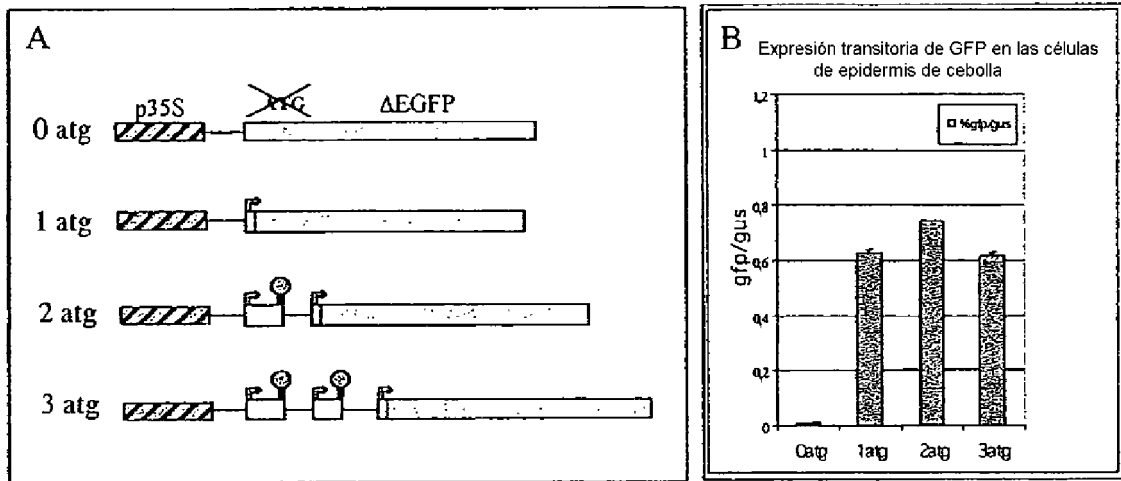


Figura 2

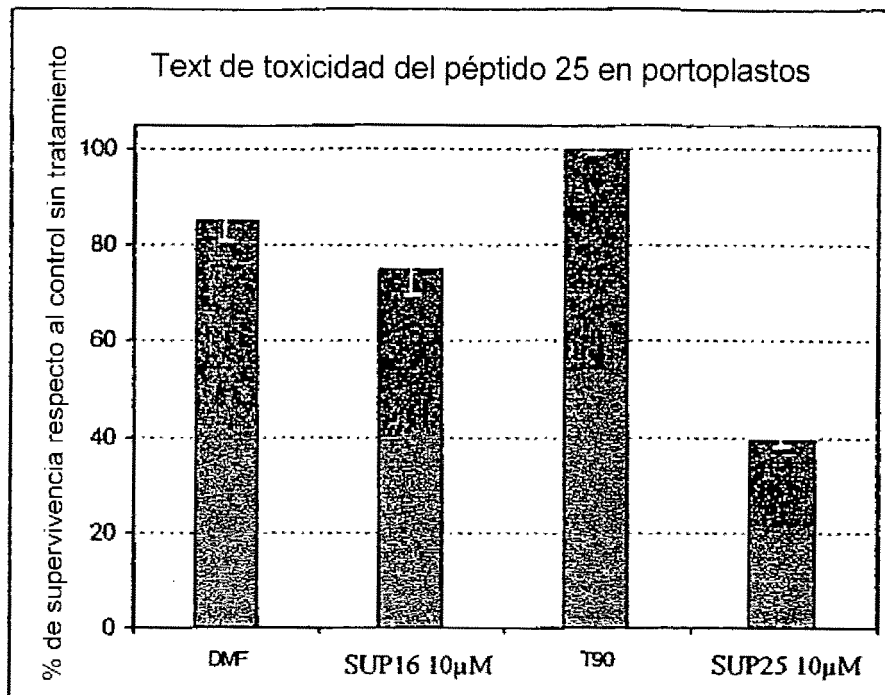


Figura 3

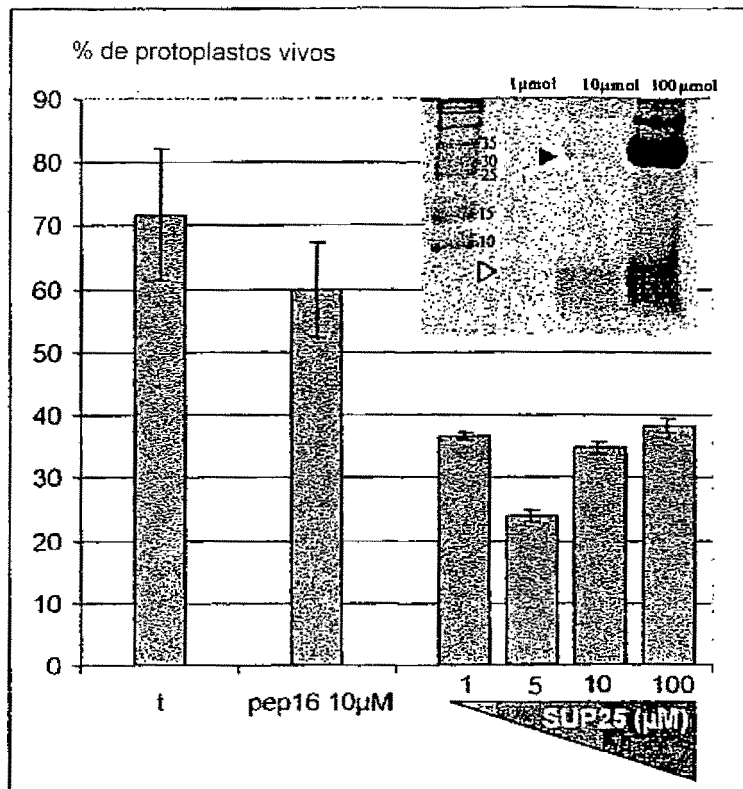


FIGURA 4

ES 2 346 052 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> *Centre National de la Recherche Scientifique*
GALLOIS Patrick
5 HECHT Valérie
VAROQUAUX Fabrice
BLANVILLAIN Robert
PUERTOLAS Delphine
10 DELORME Valérie
ROBY Dominique
DELSENY Michel

<120> Nuevo péptido vegetal con actividad anti-microbiana

15 <130> CGA644s70

<160> 31

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 16
25 <212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa = cisteína o serina

35 <400> 1

Met	Trp	Trp	Leu	Val	Gly	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Leu	Ile	His	Leu	Xaa
1				5					10					15	

40 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
45 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (16)..(16)
<223> Xaa = cisteína o serina

55 <400> 2

Met	Trp	Trp	Leu	Val	Gly	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Leu	Ile	His	Leu	Xaa
1				5					10					15	

60 Ala

<210> 3
<211> 18
65 <212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 346 052 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
5 <223> Xaa = cisteína o serina

<400> 3

10 Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

Ala Phe

15 <210> 4
<211> 19
<212> PRT
20 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (16)..(16)
<223> X= cisteína o serina

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa= cisteína o serina

35 <400> 4

Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

40

Ala Phe Arg

<210> 5
45 <211> 20
<212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16) .. (16)
55 <223> Xaa = cisteína o serina

<400> 5

60 Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

65 Ala Phe Arg Glu
20

ES 2 346 052 T3

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (16)..(16)
<223> Xaa = cisteína o serina

<400> 6
15
Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15
20
Ala Phe Arg Glu Arg
20

25 <210> 7
<211> 22
<212> PRT
30 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> MISC_FEATURE
35 <222> (16)..(16)
<223> Xaa = cisteína o serina

<400> 7
40
Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15
45
Ala Phe Arg Glu Arg Leu
20

50 <210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
60 <222> (16)..(16)
<223> Xaa = cisteína o serina

<220>
65 <221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa = cisteína o serina

ES 2 346 052 T3

<400> 8

Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

5

Ala Phe Arg Glu Arg Leu Xaa
20

10

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

15

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> MISC_FEATURE

20

<222> (16)..(16)

<223> Xaa = cisteína o serina

<220>

25

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa = cisteína o serina

30

<400> 9

Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

35

Ala Phe Arg Glu Arg Leu Xaa His
20

40

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

45

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

50

<223> Xaa= cisteína o serina

<220>

55

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa= cisteína o serina

60

<400> 10

Met Trp Trp Leu Val Gly Leu Thr Pro Val Glu Leu Ile His Leu Xaa
1 5 10 15

65

Ala Phe Arg Glu Arg Leu Xaa His Leu
20 25

ES 2 346 052 T3

<210> 11
<211> 48
<212> ADN
5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (46)..(48)
<223> nnn = codón cisteína o codón serina

<400> 11
15
atgtggtggc tagtgggact tacaccagtt gagtggatcc atcttnnn 48

<210> 12
20 <211> 51
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
30 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

<400> 12
35 atgtggtggc tagtgggact tacaccagtt gagtggatcc atcttnnngc a 51

<210> 13
<211> 54
40 <212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> nnn = codón cisteína o codón serina

50 <400> 13
atgtggtggc tagtgggact tacaccagtt gagtggatcc atcttnnngc attt 54

55 <210> 14
<211> 57
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
65 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

ES 2 346 052 T3

<400> 14

atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcega 57

5

<210> 15

<211> 60

<212> ADN

10 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (46) .. (48)

<223> nnn = codón cisteína o codón serina

<400> 15

20

atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcegagag 60

<210> 16

25 <211> 63

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (46) .. (48)

35 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

<400> 16

atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcegagag 60

40

cgt 63

<210> 17

45 <211> 66

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

50 <220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(48)

<223> nnn = codón cisteína o codón serina

55

<400> 17

atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcegagag 60

60

cgtctc 66

<210> 18

65 <211> 69

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 346 052 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(98)
 5 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (67)..(69)
 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

15 <400> 18

atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcgagag 60
 cgtctcann 69

<210> 19
 <211> 72
 25 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (46)..(48)
 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(69)
 40 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

<400> 19

45 atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttnnngc atttcgagag 60
 cgtctcennnc at 72

50 <210> 20
 <211> 75
 <212> ADN
 55 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (46)..(48)
 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

<220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (67)..(69)
 <223> nnn = codón cisteína o codón serina

ES 2 346 052 T3

	<400> 20	
	atgtggtggc tagttggact tacaccagtt gagttgatcc atcttinnngc atttcgagag	60
5	cgtctcnnnc atctc	75
	<210> 21	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 21	
20	caagtaagct tgctcagttg	20
	<210> 22	
	<211> 29	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 22	
35	gctctagata ctagagatg acagagacg	29
	<210> 23	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 23	
50	actgagctcg ttgtattttt aatcgaatgg	30
	<210> 24	
	<211> 31	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador	
	<400> 24	
65	acggaagctt tacttagaga tgacagagac g	31

ES 2 346 052 T3

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
10
<400> 25

cgtcttcgag aaaagtgtta g 21

15
<210> 26
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
25
<400> 26

atcagtcaga cagtcaaatt c 21

30
<210> 27
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
40
<400> 27

tacttagaga tgacagagac g 21

45
<210> 28
<211> 86
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Oligonucleótido complementario de la SEC ID N° 29

<400> 28

gatcatgtgg tggctagttg gacttacacc agttgagttg atccatcttt gcgcatttcg 60
agagcgtctc tgcctctct aatgca 86

<210> 29
65 <211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 346 052 T3

<220>

<223> Oligonucleótido complementario de la SEC ID N° 28

5 <400> 29

ttagagatga cagagacgct ctcgaaatgc gcaaagatgg atcaactcaa ctggtgtaag 60

tccaactagc caccacat 78

10

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

20

<400> 30

cttcgtcaac atggtggagc 20

25

<210> 31

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

35

<400> 31

ctagctagag gatcgatcc 19

40

45

50

55

60

65