



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 787**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04803501 .8**
96 Fecha de presentación : **03.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1689871**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **Control de la expresión de genes en plastos.**

30 Prioridad: **03.12.2003 PCT/EP03/13656**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.08.2009

73 Titular/es: **Icon Genetics GmbH**
Briennerstrasse 12A
80333 München, DE

72 Inventor/es: **Mühlbauer, Stefan**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Control de la expresión de genes en plastos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la biotecnología vegetal en general y, más particularmente, a un proceso y a vectores para la transformación plastidial de plantas. Específicamente, la presente invención se refiere a un proceso de transformación genética de plastos vegetales, vectores para el proceso y plantas o células vegetales obtenidas u
 10 obtenibles de acuerdo con el proceso de la invención. Además, la presente invención se refiere a vectores que confieren expresión génica inducible en plastos vegetales, preferiblemente por aplicación de inductores químicos. La presente invención también se refiere a un proceso de generación de plantas transgénicas o células vegetales transformadas en sus plastos que tienen plastoma, en los que puede inducirse, reprimirse o regularse la expresión de los genes introducidos por aplicación de sustancias químicas u otros estímulos externos o internos.

15 **Antecedentes de la invención**

Los plastos y mitocondrias contienen su propio ADN, transcritos de ADN en forma de ARN mensajero (ARNm), ribosomas y al menos algunos de los ARNt necesarios que se requieren para la descodificación de la información genética (Marechal-Drouard *et al.*, 1991). Sin embargo, no son autónomos y dependen de productos génicos codifi-
 20 cados en el núcleo celular. No obstante, su información genética es de suficiente complejidad para hacer de ellos una diana atractiva para la tecnología de genes. Este es particularmente el caso de los plastos, porque los plastos codifican aproximadamente el 50% de las proteínas necesarias para su función principal (fotosíntesis) en el interior de la célula vegetal. Los plastos también codifican sus ARN ribosómicos, la mayoría de sus ARNt y proteínas ribosómicas. En
 25 total, el número de genes en el plastoma está en el intervalo de 120 (Palmer, 1991). Sin embargo, la inmensa mayoría de las proteínas que se encuentran en los plastos se importan desde el compartimento genético nuclear/citosólico.

Con el desarrollo de tecnologías de clonación molecular generales, pronto se hizo posible modificar genéticamente las plantas superiores mediante transformación. El énfasis principal en la transformación vegetal estaba y sigue estando
 30 en la transformación nuclear, ya que la mayoría de los genes, aproximadamente 26.000 en el caso de *Arabidopsis thaliana*, cuya secuencia completa se publicó recientemente (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), se encuentra en el núcleo de la célula. La transformación nuclear era más fácil de conseguir, ya que estaban disponibles vectores biológicos tal como *Agrobacterium tumefaciens*, que podían modificarse para permitir eficazmente la transformación nuclear (Galvin, 1998). Además, el núcleo es accesible más directamente para ácidos nucleicos extraños, mientras
 35 que los orgánulos están rodeados por dos membranas de envuelta que son, generalmente hablando, impermeables a macromoléculas tales como ADN.

Es muy deseable una capacidad de transformación de plastos ya que podría hacerse uso de la elevada dosifica-
 40 ción génica en estos orgánulos que portan el potencial de niveles de expresión extremadamente elevados de transgenes. Además, la transformación plastidial es atractiva porque los rasgos codificados por plastos no son transmisibles por el polen; por lo tanto, los riesgos potenciales de escapes de transgenes involuntarios a parientes silvestres de plantas transgénicas se reducen considerablemente. Otras ventajas potenciales de la transformación plastidial inclu-
 45 yen la viabilidad de la expresión simultánea de múltiples genes como una unidad policistrónica y la eliminación de efectos posicionales y silenciamiento génico que pueden obtenerse como resultado después de una transformación nuclear.

Los métodos que permiten la transformación estable de plastos podrían de hecho desarrollarse para plantas superio-
 res. Hasta ahora, están disponibles dos métodos diferentes, es decir, bombardeo de partículas de tejidos, en particular
 50 tejidos foliares (Svab *et al.*, 1990), y tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG) en presencia de vectores de transformación adecuados (Koop *et al.*, 1996). Ambos métodos median la transferencia de ADN plasmídico a través de las dos membranas de envuelta hacia el estroma de los orgánulos. En Heifetz (2000) y Koop *et al.* (1996) se proporciona una visión de conjunto de la tecnología de transformación plastidial.

Los métodos de transformación plastidial normalmente dependen de vectores de transformación en los que uno
 55 o más transgenes están flanqueados por secuencias del plastoma que dirigen la inserción de los genes extraños por recombinación homóloga. La expresión del gen o genes introducidos se consigue colocando la región codificante bajo el control de elementos reguladores. Estos elementos reguladores normalmente contienen un promotor activo en plastos y están unidos operativamente a regiones no traducidas 5' y 3'. Pueden obtenerse promotores activos en plastos usando secuencias activadoras de la transcripción procedentes del plastoma o usando otras secuencias de origen
 60 sintético o natural que median la actividad de transcripción en el plastoma. Son ejemplos de promotores de plastos que median una fuerte actividad transcripcional el promotor *rrn* del operón de ARNr-16S (Svab y Maliga, 1993) o el promotor de *psbA* (Staub y Maliga, 1993). Un ejemplo de un promotor heterólogo es el promotor del fago T7 que, sin embargo, sólo es activo si está presente la correspondiente ARN-polimerasa de T7. De manera alternativa, es posible insertar una región o regiones codificantes extrañas en un sitio del plastoma transcripcionalmente activo, expresando
 65 de esta manera los genes introducidos mediante unión operativa a genes ya presentes en el plastoma (Staub y Maliga, 1995). En este caso, es necesario fusionar la región codificante a expresar con una secuencia que media el inicio de la traducción, por ejemplo, un sitio de unión al ribosoma.

Los niveles de transcrito del gen o genes introducidos dependen de la actividad del promotor y de las tasas de renovación del ARNm. En el caso en el que el gen o genes introducidos están controlados por elementos promotores derivados de plastos, los patrones de transcripción se parecen a los patrones de transcripción de los genes plastidiales correspondientes. Si se ha generado un operón artificial introduciendo el transgén o transgenes en un sitio del plastoma transcripcionalmente activo, la actividad de transcripción se determina mediante el correspondiente promotor cadena arriba.

Los genes plastidiales se transcriben activamente en la mayoría de las células, aunque hay variaciones en la intensidad que dependen del desarrollo, del tejido o del entorno. En los cloroplastos verdes del tejido fotosintético (por ejemplo, hojas), puede observarse una fuerte actividad transcripcional permanente de los genes plastidiales, que en cierta medida está afectada por la actividad fotosintética (por ejemplo, día frente a noche o condición de temperatura). Como consecuencia, los genes extraños introducidos en el plastoma se transcriben casi permanentemente. Si el gen o los genes introducidos están unidos operativamente a una secuencia o secuencias que median una fuerte actividad de traducción, el nivel de expresión del gen extraño puede ser extraordinariamente elevado (Kuroda y Maliga, 2001). Esto es cierto al menos para todas las partes verdes de la planta y se extiende desde la fase de crecimiento hasta la fase reproductiva.

Por lo general se desea alcanzar un alto nivel de expresión del gen introducido, por ejemplo, para producir grandes cantidades de proteínas farmacéuticas en plantas (tales como somatotropina) o para generar plantas con un elevado nivel de resistencia a plagas (tales como la proteína cry de *B. t.*). Sin embargo, en muchos casos la producción permanente del producto génico recombinante es indeseable o incluso perjudicial. Una actividad permanente del transgén puede afectar negativamente a la capacidad de crecimiento o incluso a la salud vegetal de plantas de cultivo por privación de energía metabólica para la producción del transgén.

Una actividad permanente del transgén es incluso más adversa, si la proteína resultante es tóxica para el plasto o la célula vegetal. Las proteínas con efectos ligeramente tóxicos en la planta pueden afectar negativamente al desarrollo normal y a la producción de biomasa de la planta. También puede estar negativamente influenciada la expresión de la proteína recombinante deseada. Las proteínas recombinantes tóxicas también pueden impedir que la planta entre en la fase reproductiva y por tanto impedir la producción de semillas. Un ejemplo de efectos nocivos de productos génicos recombinantes en plastos es la síntesis de polihidroxibutirato en tabaco, en la que contenidos significativos del producto conducen a una reducción del crecimiento (Lössl *et al.*, 2003). Si el producto proteico de un gen introducido es muy tóxico para el plasto o la célula vegetal, la generación de la planta transplastómica puede ser completamente imposible.

Los efectos tóxicos causados por genes introducidos pueden ser el resultado de un efecto tóxico de la propia proteína o pueden ser el resultado de un efecto indirecto de la proteína en el metabolismo. Un ejemplo de un efecto indirecto es el caso en el que el gen introducido codifica una enzima que cataliza la producción de sustancias tóxicas. Tales efectos perjudiciales de proteínas ligeramente tóxicas o muy tóxicas pueden evitarse si el gen o genes introducidos no se expresan permanentemente, desacoplando de esta manera la fase vegetativa de la planta transgénica de la fase en la que el transgén o transgenes se expresan en la planta totalmente desarrollada.

Además, cuando se consideran aspectos de bioseguridad, la expresión incontrolada de transgenes en plantas transplastómicas puede ser también un problema con los productos transgénicos que no presentan efectos negativos sobre el crecimiento de plantas. Especialmente para productos génicos con efectos desconocidos o potencialmente nocivos en otros organismos, la expresión permanente de estos productos génicos en plantas transplastómicas durante todo el período de crecimiento conlleva riesgos impredecibles. Por lo tanto, es muy deseable un método para controlar la expresión de tales productos génicos. Por consiguiente, el control de la expresión de transgenes en plastos es un factor importante en la producción de plantas transplastómicas.

Hasta ahora, sólo hay un ejemplo para la inducción de la expresión génica en plastos (documento US20020062502). Los inventores hicieron uso del sistema de ARN polimerasa de T7/promotor de T7 (McBride *et al.*, 1994; documento US 5.925.806). Una ARN polimerasa de T7 dirigida a plastos, codificada por el núcleo media la transcripción de un gen localizado en plastos que está bajo el control de un promotor de T7. Para hacer este sistema apropiado para la expresión inducible del transgén plastidial, el gen de la polimerasa de T7 se puso bajo el control de un promotor químicamente inducible (promotor PR-1a, inducción con benzotiadiazol). Sin embargo, este sistema no proporciona una inducibilidad directa de genes plastidiales mediante factores externos o internos. En lugar de ello, se percibe una señal en el núcleo y se transmite al plasto mediante un intermedio de proteína. Sin embargo, este sistema tiene graves desventajas. En primer lugar, depende de transformantes nucleares que son capaces de la percepción y transmisión de señales. Las plantas inducibles no pueden generarse sólo por transformación plastidial. Es posible la propagación indeseada del transgén nuclear mediante transferencia de polen, que está casi excluida para los transformantes de cloroplastos. Además, la generación de dos transformantes diferentes, transformantes nucleares y transformantes plastidiales, requiere mucho tiempo. Para generar plantas transformadas en ambos compartimentos, el transformante nuclear y el transformante plastidial tienen que hibridarse, o ambas transformaciones tienen que hacerse posteriormente. Un método para la regulación de transgenes en plastos, que sólo dependa de la transformación plastidial, ofrecería ventajas significativas.

Otro problema cuando se usan métodos de transformación plastidial convencionales surge de los efectos tóxicos de los genes a expresar en los plastos en las bacterias usadas para la clonación del vector de transformación: El promotor

de plastos y elementos líder que se usan generalmente para expresar los transgenes plastidiales también son activos frecuentemente en bacterias y conducen a la producción de la proteína correspondiente en el hospedador de clonación. Si el hospedador de clonación no tolera esta proteína, la construcción del vector de transformación usando técnicas de biología molecular convencionales se obstaculiza seriamente. Incluso genes para proteínas con menos efectos tóxicos pueden ser difíciles de clonar, si están fusionadas a elementos reguladores que conducen a un nivel de expresión extraordinariamente elevado. Sería muy deseable un método en el que la expresión de un transgén en el hospedador de clonación se reduzca o desactive.

Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar un proceso de control de la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma. Un objeto adicional es proporcionar plantas que tengan una secuencia de interés codificada por el plastoma, en las que pueda controlarse la expresión de dicha secuencia de interés. Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso eficaz y muy versátil de transformación genética de plastos vegetales, que permita la producción de sustancias en plastos que son tóxicas para los plastos o las plantas. Otro objeto de la invención es permitir la producción de plantas transgénicas que muestren una salud vegetal normal y una capacidad de crecimiento independiente del gen o genes introducidos. Otro objeto de la invención es minimizar el riesgo de captación indeseada de sustancias producidas en las plantas transgénicas y por tanto, aumentar la bioseguridad. Otro objeto de la invención es simplificar la clonación en bacterias de vectores de transformación plastidial que contienen secuencias que son tóxicas para las bacterias.

20 Descripción general de la invención

Los objetos anteriores se resuelven mediante un proceso de control de la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma en una planta o en células vegetales aplicando externamente a dicha planta o a dichas células vegetales una señal química como una señal de control, en el que dicha señal de control está adaptada para una interacción de dicha señal química con el represor lac como un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos y en el que la expresión de dicha secuencia de interés se controla mediante dicha interacción y aplicando externamente dicha señal de control, como se define en la reivindicación 1. En la invención, dicha señal química es lactosa o un análogo de la misma. Preferiblemente, dicho componente intraplastidial es un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión plastidial de dicha secuencia de interés pero no de otras secuencias plastidiales.

La invención proporciona adicionalmente una planta o células vegetales capaces de una expresión controlada de una secuencia de interés codificada por el plastoma, comprendiendo dicha planta o células vegetales una secuencia de interés codificada por el plastoma y que tiene o codifica un componente intraplastidial heterólogo de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos, estando dicho componente adaptado para interaccionar con una señal de control química proporcionada externamente de manera que dicha expresión de dicha secuencia de interés pueda controlarse por dicha señal de control, como se define en la reivindicación 7. La planta de la invención comprende plantas en desarrollo en todas las fases del desarrollo, incluyendo las semillas. También comprende partes de plantas como hojas.

La invención proporciona adicionalmente un proceso para producir una planta transplastómica o células vegetales transplastómicas transformadas en su plastoma con una secuencia de interés, que comprende transformar una planta o células vegetales en su plastoma con dicha secuencia de interés unida operativamente a un operador lac, y con una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un represor lac intraplastidial.

La invención también proporciona un sistema para controlar la expresión de una secuencia de interés en una planta transplastómica o en células vegetales transplastómicas, que comprenden la planta o células vegetales de la invención y lactosa o un análogo de la misma para controlar dicha expresión en dicha planta o células vegetales.

Los inventores han descubierto un método general de control de expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma en plantas o células vegetales mediante una señal de control aplicada externamente. Este método general se basa en la interacción de dicha señal química o una física con un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos. De esta manera, el proceso de la invención no requiere la generación de transformantes nucleares de dicha planta o dichas células vegetales. Una base de la invención es el sorprendente hallazgo de que pueden proporcionarse señales químicas y físicas, en particular señales químicas, a plantas o células vegetales de manera que alcanzan y/o entran en los plastos, por lo que es posible una interacción de dicha señal con un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos.

Los plastos están rodeados por una envoltura de doble membrana y está regulada la entrada y salida de moléculas. Los plastos no tienen grandes poros en comparación con los poros del núcleo que permiten el paso casi sin obstáculos de moléculas pequeñas hacia dentro y hacia fuera del núcleo. Adicionalmente, las señales físicas o químicas proporcionadas externamente tienen que atravesar la membrana plasmática para entrar en el citoplasma desde donde pueden entrar en los plastos. Además, las señales de control tienen que atravesar la pared celular vegetal para ser capaces de entrar en el citoplasma y en los plastos. Por lo tanto, fue muy sorprendente descubrir que pueden proporcionarse dichas señales físicas o químicas de la invención a células vegetales o plantas de manera que pueden acumularse en los plastos en concentraciones suficientes para permitir controlar la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma.

El proceso de control de la invención requiere la generación de la planta o células vegetales transplastómicas de acuerdo con la invención. Esto puede conseguirse transformando una planta o células vegetales en su plastoma con dicha secuencia de interés y una secuencia de nucleótidos heteróloga que sea o codifique dicho componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos. Dicha secuencia de interés y dicha secuencia de nucleótidos heteróloga pueden introducirse en los plastos de dicha planta o dichas células vegetales en un tipo de ácido nucleico recombinante (o vector) o en ácidos nucleicos recombinantes diferentes, por ejemplo, mediante co-transformación. Preferiblemente, dicha secuencia de interés y dicha secuencia de nucleótidos heteróloga se introducen con el mismo vector. Se conocen en la técnica métodos de transformación plastidial para varias especies vegetales. La invención también puede aplicarse a plantas para las que la transformación plastidial llega a ser posible en el futuro. En la transformación plastidial, típicamente se usa recombinación homóloga para introducir una secuencia deseada en un locus deseado del plastoma. Si dicha secuencia de interés y dicha secuencia que es o que codifica dicho componente intraplastidial se introducen en el plastoma con un vector, pueden estar presentes de manera consecutiva en dicho vector flanqueadas por secuencias flanqueantes homólogas para recombinación homóloga con el plastoma.

Con respecto a dicha secuencia de interés, la invención no está limitada. La secuencia de interés puede ser una secuencia nativa para el plastoma de la planta a transformar, que permite, por ejemplo, controlar la expresión de un gen plastidial nativo de acuerdo con la invención. Sin embargo, preferiblemente, la secuencia de interés es heteróloga para la planta o para las células vegetales. La secuencia de interés puede ser una secuencia que codifica una proteína de interés a expresar en dicha planta o en dichas células vegetales. La secuencia de interés puede introducirse en los plastomas como parte de un ácido nucleico recombinante que contiene adicionalmente una secuencia reguladora de la transcripción, preferiblemente heteróloga, (por ejemplo, un promotor) unida operativamente a dicha secuencia de interés. Dicho ácido nucleico recombinante puede contener adicionalmente una secuencia de nucleótidos, preferiblemente heteróloga, que sea o codifique un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos. En una realización de la invención, dicha secuencia de nucleótidos que es o que codifica un componente intraplastidial es idéntica a dicha secuencia reguladora de la transcripción mencionada anteriormente. En otra realización, dicha secuencia de nucleótidos que es o que codifica un componente intraplastidial se usa junto con dicha secuencia reguladora de la transcripción de dicha secuencia de interés.

Dicha señal de control de la invención es la oportunidad que permite el control de la expresión de dicha secuencia de interés en dicha planta o dichas células vegetales mediante la aplicación externa de dicha señal de control. Dicha señal de control está adaptada para una interacción de dicha señal química con dicho componente intraplastidial de la invención (véase a continuación). Dicha señal de control es una señal química o una fuente de una señal química. Son ejemplos de señales físicas, como dicha señal de control, la luz (particularmente un cambio en la intensidad de luz, un cambio en el ciclo de luz-oscuridad al que la planta o las células vegetales están expuestas, un cambio en las composiciones espectrales de la luz como el color de la luz, etc.) y un cambio de temperatura.

Dicha señal química o dicha fuente puede ser una señal química proteica (es decir, una proteína) o una señal química no proteínica (no proteína). En este documento, una señal química proteica es una señal que puede producirse expresando (transcribiendo y/o traduciendo) un ácido nucleico en un organismo como una planta o en bacterias, es decir una proteína; una señal química no proteica no puede producirse expresando un ácido nucleico en un organismo. Dicha señal química puede ser un compuesto químico de alto peso molecular o de bajo peso molecular. Son ejemplos de compuestos químicos de alto peso molecular utilizables como una señal química proteínas (en lo sucesivo las proteínas usadas como una señal aplicada externamente se denominan proteínas señal) o ácidos nucleicos (los ácidos nucleicos usados como ácidos nucleicos aplicados externamente también se denominan ácido nucleico señal en este documento). Son ejemplos de señales de ácido nucleico ADN o ARN que puede interferir (por ejemplo mediante interferencia de ARN o induciendo un cambio conformacional en un ARN regulador de la traducción unido operativamente a un transcrito de dicha secuencia de interés) o promover la expresión de dicha secuencia de interés en plastos. Son ejemplos de compuestos químicos de bajo peso molecular (que son preferiblemente no proteicos) inductores como isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) o análogos del mismo como lactosa, tetraciclina, arabinosa, etanol, esteroides, iones de cobre u otros inductores de sistemas de expresión génica inducibles como los citados en el documento US20020062502. En lugar de usar dichos inductores en una forma pura, las composiciones que contienen dichos inductores pueden aplicarse externamente a dicha planta o célula vegetal. Un ejemplo de una composición de este tipo es el suero de la leche que contiene lactosa. El suero de la leche se obtiene como un subproducto en la elaboración de queso y una fuente de lactosa económica.

Los compuestos químicos aplicados externamente pueden estar sujetos a reacciones químicas en células vegetales, por lo que dicha señal química puede producirse en las células a partir de una fuente (o precursor) de dicha señal química. Son ejemplos de tales reacciones químicas las reacciones hidrolíticas de ésteres, amidas, fosfatos, etc. mediante enzimas hidrolíticas celulares, o transglucosilaciones (como la formación de 1,6-alolactosa a partir de lactosa), reacciones de transferencia de grupo fosfato o reacciones redox. En tales casos, la fuente de dicha señal química puede aplicarse externamente a dicha planta o células vegetales. Dicha señal química capaz de interactuar con dicho componente intraplastidial puede producirse después a partir de dicha fuente en células vegetales.

De manera similar, puede producirse una señal química proteica (por ejemplo, dicha proteína señal) en células vegetales expresando un ácido nucleico aplicado externamente que codifica una proteína señal. En este caso, dicho ácido nucleico es la fuente de dicha proteína señal. Dicha proteína señal se proporciona preferiblemente con un péptido

de tránsito a plastos para entrar en plastos. A continuación se proporcionan modos de aplicación externa de una proteína señal o una fuente de la misma a una planta o a células vegetales. Si se usa un ácido nucleico como fuente de una proteína señal, dicho ácido nucleico se aplica externamente a dicha planta o a dichas células vegetales. En esta realización, dicho ácido nucleico aplicado externamente no está adaptado para la integración en un cromosoma nuclear; además, no está adaptado para la inducción de la expresión de dicha proteína señal mediante aplicación externa de una pequeña señal química molecular.

Estar adaptado para una interacción de dicha señal física o química con dicho componente intraplastidial comprende que dicha señal química o física tiene que ser capaz de alcanzar y entrar en plastos después de la aplicación externa de dicha señal de control a dichas plantas o dichas células vegetales. (Proporcionar externamente dicha señal química comprende aplicar externamente dicha señal de control y opcionalmente la formación de dicha señal química a partir de una fuente de la misma). De esta manera, la señal química o física tiene que ser capaz de transferirse o de transmitirse a través de la doble membrana plastidial, la membrana celular, la pared celular y, preferiblemente, en el caso de las plantas, también a través de la cutícula. El modo de aplicación de dicha señal de control a la planta o células vegetales puede apoyar la transferencia de dicha señal química o física al interior de los plastos (véase a continuación). Fue sorprendente descubrir que dichas señales de control pueden aplicarse a las plantas o células vegetales de manera que puede controlarse la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma aplicando externamente dicha señal de control.

El proceso de esta invención no implica preferiblemente una transformación nuclear. El proceso de la invención no implica la inducción de la expresión de un gen codificado por el núcleo mediante dicha señal de control aplicada externamente.

Dicho componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos puede ser cualquier componente que esté implicado en la expresión de proteínas de plastos. Dicho componente intraplastidial está adaptado para interaccionar con dicha señal física o química, por lo que puede controlarse la expresión de dicha secuencia de interés. De esta manera, dicha señal física o química y dicho componente son parejas que se seleccionan para que dicha interacción sea posible. Son ejemplos de tales parejas de señal/componente IPTG y el represor lac; tetraciclina y el represor tet; N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona y el activador transcripcional LuxR (consúltese el ejemplo 4); polimerasa de T7 y el promotor de T7. En cualquier caso, la interacción de dicha señal con dicho componente tiene un efecto funcional sobre la expresión de dicha secuencia de interés en plastos de dicha planta o células vegetales, por lo que dicho efecto está ausente cuando dicha señal o dicho componente están ausentes.

Preferiblemente, dicho componente es un ácido nucleico o una proteína. Como un requisito mínimo, dicho componente está implicado al menos en la expresión de proteínas de plastos de dicha secuencia de interés. Preferiblemente, dicho componente no está implicado en la expresión de proteínas de plastos de otras secuencias plastidiales. En particular, preferiblemente dicho componente no está implicado en la expresión de aquellas secuencias plastidiales nativas que no sean secuencias de interés. Esto significa que dicho componente es preferiblemente necesario para controlar la expresión de dicha secuencia de interés pero tiene escasa o ninguna influencia en la expresión de otras secuencias plastidiales. Esto puede conseguirse usando un componente intraplastidial heterólogo que esté unido operativamente a dicha secuencia de interés pero no a otras secuencias del plastoma. De este modo, dicho componente puede proporcionarse de manera que se controle exclusivamente la expresión de dicha secuencia de interés.

Sin embargo, la invención permite controlar la expresión de dos, tres o más secuencias de interés (por ejemplo, para la expresión de múltiples proteínas de interés como múltiples subunidades de una proteína de interés de múltiples subunidades como un anticuerpo). En este caso, dicho componente puede usarse para controlar todas las secuencias de interés, por lo que una sola señal de control puede permitir controlar la expresión de todas las secuencias de interés. El control de varias secuencias de interés puede conseguirse fácilmente si dichas secuencias se organizan en un operón, por lo que la transcripción del operón puede controlarse, o proporcionando cada secuencia de interés con los mismos elementos reguladores de control que responden a dicha señal de control aplicada externamente o a dicho componente. De manera alternativa, cada secuencia de interés está unida operativamente a un componente intraplastidial diferente, por lo que la expresión de las diversas secuencias de interés puede controlarse independientemente por diferentes señales de control aplicadas externamente. La última alternativa puede usarse por ejemplo para cultivar una planta que contiene múltiples secuencias de interés (que codifican, por ejemplo, diferentes proteínas farmacéuticas o industriales) hasta un estado de crecimiento deseado, determinar cuál de las proteínas codificadas se desea, seguido de aplicar externamente la señal para inducir la expresión de la secuencia de interés determinada.

Dicho componente intraplastidial puede ser una proteína (por ejemplo un represor, un activador, un factor de transcripción, factores implicados en la traducción). En adelante tales proteínas se denominan proteínas reguladoras. Una proteína reguladora puede estar codificada en una secuencia de nucleótidos heteróloga que se transforma en plastos de dicha planta o dichas células vegetales, preferiblemente de manera que se integra en el plastoma por recombinación homóloga. La secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína reguladora debería contener elementos reguladores unidos operativamente para expresar dicha proteína reguladora, como un promotor y secuencias no traducidas 5' y 3'. En algunas realizaciones, la proteína reguladora se expresa de manera constitutiva, por ejemplo, si dicha proteína reguladora es un represor que reprime la expresión de dicha secuencia de interés. Los plastos de dicha planta o dicha célula vegetal pueden transformarse con dicha secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína reguladora independientemente de la transformación de dichos plastos con dicha secuencia de interés. Sin embargo,

generalmente es más conveniente transformar los plastos de dicha planta o dichas células vegetales simultáneamente con dicha secuencia de interés y con dicha secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica dicho componente intraplastidial, por ejemplo mediante transformación con dicho ácido nucleico recombinante que contiene dicha secuencia de interés y dicha secuencia de nucleótidos heteróloga (usando por ejemplo un vector como pICF10501 que se muestra en la Figura 1).

Si dicha proteína reguladora se usa como dicho componente intraplastidial, la expresión de dicha secuencia de interés puede depender de la unión de dicha proteína reguladora a un elemento de secuencia reguladora de dicha secuencia de interés (por ejemplo, a un operador). La afinidad de unión de dicha proteína reguladora a dicha secuencia reguladora debería entonces depender de la interacción de dicha proteína reguladora con dicha señal física o química. Como ejemplo, dicha proteína reguladora puede ser un represor (por ejemplo lacI o tetR) y la afinidad de unión del represor a un operador depende de una señal química de bajo peso molecular (por ejemplo, IPTG o tetraciclina). Para el uso en la presente invención pueden ajustarse varios sistemas de expresión de proteínas inducibles conocidos. Son ejemplos los sistemas inducibles por calor (documento US 05187287) e inducibles por frío (documento US 05847102), un sistema inducible por cobre (Mett *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 4567-4571), sistemas inducibles por esteroides (Aoyama y Chua, 1997, *Plant J.*, 11, 605-612; McNellis *et al.*, 1998, *Plant J.*, 14, 247-257; documento US 06063985), un sistema inducible por etanol (Caddick *et al.*, 1997, *Nature Biotech.*, 16, 177-180; documento WO 09321334) y un sistema inducible por tetraciclina (Weinmann *et al.*, 1994, *Plant J.*, 5, 559-569). Un sistema químicamente inducible recientemente desarrollado para plantas usa un promotor quimérico que puede activarse mediante el glucocorticoide dexametasona y desactivarse mediante tetraciclina (Bohner *et al.*, *Plant J.*, 19, 87-95). Para una revisión sobre sistemas químicamente inducibles véase: Zuo y Chua (2000, *Current Opin. Biotechnol.*, 11, 146-151). El sistema inducible para la presente invención es el sistema lac basado en el operón lac de *E. coli*. Nunca se han usado sistemas de expresión inducibles procariotas para conseguir la expresión controlada de una secuencia de interés codificada por el plastoma en plantas.

Si para la invención se usa el sistema lac, dicha proteína reguladora es el represor lac que preferiblemente se expresa de manera constitutiva. El represor lac se une al operador lac que es una secuencia reguladora unida operativamente a dicha secuencia de interés. El represor lac se une al operador lac en ausencia de IPTG o un análogo del mismo como lactosa. Si se aplica externamente IPTG o un análogo del mismo como dicha señal química a la planta o a dichas células vegetales, puede difundirse al interior de plastos e interaccionar con el represor lac que está unido al operador lac. El represor lac que tiene IPTG unido (o un análogo del mismo como lactosa o 1,6-alolactosa) se disocia del operador, permitiendo la transcripción y expresión de la secuencia de interés.

Otros ejemplos preferidos de dicho componente intraplastidial de la invención son ácidos nucleicos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser elementos reguladores que regulan la expresión de dicha secuencia de interés, como un promotor. Preferiblemente, dicho elemento regulador como dicho componente es una secuencia reguladora de la transcripción heteróloga como un promotor heterólogo que está unido operativamente a dicha secuencia de interés. Dicha señal aplicada externamente puede ser entonces una proteína (en adelante denominada proteína señal) que es capaz de interaccionar con dicha secuencia reguladora de la transcripción. Un ejemplo de un promotor heterólogo como dicho componente intraplastidial es el promotor del bacteriófago T7. La aplicación de la polimerasa de T7 como dicha señal química en los plastos permite una interacción de la polimerasa de T7 con el promotor de T7 y la expresión de dicha secuencia de interés. Dicho elemento regulador debería ser heterólogo para asegurarse de que la señal química controla exclusivamente la expresión de dicha secuencia de interés pero tiene escaso o ningún efecto sobre la expresión de otras secuencias plastidiales.

En otra realización en la que dicho componente intraplastidial es un ácido nucleico, dicho componente puede ser o puede estar contenido en un ARN regulador de la traducción. Dicho ARN regulador de la traducción puede ser una región no traducida 5' (5'-UTR) modificada por ingeniería genética de un ARNm que comprende un transcrito de dicha secuencia de interés; dicha señal química o física puede ser capaz de interaccionar con dicha 5'-UTR de dicho ARNm. Dicha 5'-UTR puede comprender por ejemplo un aptámero de ARN capaz de regular la traducción o terminación de la transcripción de dicho ARNm. Este tipo de regulación puede funcionar mediante estructuras secundarias alternativas de dicho aptámero de ARN. Los cambios de conformación de dicho ARNm pueden producirse por la unión de dicha señal química al aptámero de ARN de dicho ARNm. Dicha señal química aplicada externamente es preferiblemente una señal química de bajo peso molecular como el mononucleótido flavina (Winkler *et al.* 2002) o teofilina (consúltese el ejemplo 6). Adicionalmente, se describen a continuación realizaciones en las que dicho componente intraplastidial es ARN.

Dicho ARNm puede comprender elementos ribointerruptores (Winkler *et al.* 2002) capaces de regular la traducción o terminación de la transcripción de dicho transcrito. La modulación de la traducción o terminación de la transcripción puede funcionar mediante estructuras secundarias alternativas de dichos elementos ribointerruptores. Los cambios de conformación de dicho ARNm pueden producirse a través de la unión de dicha señal química o física por el ARNm.

Además, dicho componente intraplastidial puede ser un potenciador o un silenciador que está unido operativamente a dicha secuencia de interés y dicha señal química o física es capaz de interaccionar con dicho potenciador o dicho silenciador.

Dicho componente de la invención es un componente intraplástidial. "Intraplástidial" significa que dicho componente es o procede de un ácido nucleico introducido en el plastoma o una proteína codificada por el plastoma. Además, la interacción de dicho componente con dicha señal física o química tiene lugar predominantemente dentro de los plastos. La interacción en células vegetales fuera de los plastos no consigue el control de la expresión de dicha secuencia de interés.

A continuación se describen modos de aplicación de dicha proteína señal o una fuente de la misma. Si se usa una proteína como señal aplicada externamente (proteína señal), hay diversas posibilidades respecto al modo de aplicación a plantas o células vegetales. A continuación se describen dichas posibilidades, en los documentos PCT/EP03/13016, PCT/EP03/13018, PCT/EP03/13021 y referencias citadas en esos documentos como *Science* (2000) 290, 979-982 y documento WO0189283. En lugar de proporcionar dicha proteína señal directamente a dicha planta o células vegetales, puede usarse un ácido nucleico (aplicado externamente) que codifique dicha proteína señal como una fuente de dicha proteína señal. Dicho ácido nucleico puede aplicarse de manera que la expresión de la proteína señal sea posible en las células de dicha planta. Dicho ácido nucleico puede ser ADN o ARN. Si el ácido nucleico (señal) es ADN, la transcripción puede tener lugar en los plastos. Si dicho ácido nucleico (señal) es ARN, la traducción de la proteína señal puede tener lugar en el citoplasma de células de dicha planta. Preferiblemente, dicho ácido nucleico es un vector viral de ARN o un vector viral de ADN. Dicho vector viral debería ser infeccioso. El vector viral puede ser capaz de la amplificación en células de la planta, que permite una fuerte expresión de la proteína señal. Preferiblemente, el vector viral es además capaz del movimiento de célula a célula o sistémico dentro de la planta, que permite controlar la expresión de dicha secuencia de interés en células no a las que no se les proporcionó externamente dicho vector viral. Para una revisión sobre el uso de vectores virales véase: Porta y Lomonosoff, 1996, *Mol. Biotechnol.*, 5, 209-221; Yusinov *et al.*, 1999, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 240, 81-94). Además, los siguientes documentos describen sistemas basados en vectores virales de ADN y ARN: Kumagai *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 427-430; Mallory *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20, 622-625; Mor *et al.*, 2003, *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 430-437; documentos US5316931; US5589367; US5491076; US5977438; US5981236; WO0229068; WO02088369; WO02097080; WO9854342. Además, pueden usarse copias infecciosas de vectores virales de ARN (Kumagai *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1679-1683). Entre los vectores virales de ADN y ARN, se prefieren los vectores virales de ARN (es decir, vectores que proceden de virus de ARN). Son virus de ARN preferidos en los que puede basarse un vector viral de ARN tobamovirus, particularmente virus del mosaico del tabaco. Si dicha proteína señal se expresa en dichas células vegetales pero fuera de los plastos, la proteína señal debería proporcionarse preferiblemente con un péptido de tránsito a plastos que permite dirigir dicha proteína señal hacia plastos.

Se conocen en general en la técnica métodos de cómo puede aplicarse un ácido nucleico a dicha planta o a dichas células vegetales. Son métodos preferidos la transformación mediada por *Agrobacterium* o la infiltración de hojas.

El proceso de control de la invención puede usarse para inducir o suprimir la expresión de dicha secuencia de interés, por lo que se prefiere la inducción. La supresión de la expresión de una secuencia de interés puede conseguirse por ejemplo usando un operador (como el operador lac) unido operativamente a dicha secuencia de interés, pero no se expresa ningún represor en dichos plastos en primer lugar. Cuando se desea la supresión, el represor puede proporcionarse externamente a dichos plastos como una proteína señal.

El proceso de control puede realizarse en plantas intactas o en plantas después de la recolección de dichas plantas. Además, el proceso de control puede realizarse en células vegetales, por ejemplo, en cultivos celulares de células vegetales.

El proceso de la invención puede realizarse con cualquier planta para la que existan métodos de transformación plastidial en la actualidad o en el futuro. Se prefieren plantas de cultivo superiores. Son más preferidas las plantas dicotiledóneas. Son más preferidas las Solanaceae y Brassicaceae. Se han elaborado protocolos de transformación plastidial al menos para las siguientes especies: Tabaco (Svab Z, Maliga P, *Proc Natl Sci USA* 90: 913-7 (1993)); *Arabidopsis* (Sikdar *et al.*, *Plant Cell Reports* 18: 20-24 (1998)); Patata (Sidorov *et al.*, *Plant J* 19: 209-216 (1999)); Tomate (Ruf *et al.*, *Nat Biotechnol* 19, 870-5 (2001)); Lesquerella (Skarjinskaia *et al.*, *Transgenic Res.* 12: 115-122 (2003)); colza (Hou *et al.*, *Transgenic Res.* 12:111-114 (2003)); Zanahoria (Kumar *et al.*, *Plant Physiol* (2004)); y Arroz (Khan *et al.*, *Nat Biotechnol* 17: 910-5 (1999)).

Realizaciones preferidas

El proceso de control de la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma en una planta o en células vegetales de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho represor lac no está implicado en la expresión de secuencias plastidiales que no sean dicha secuencia de interés.

Preferiblemente, el proceso de control de la expresión de dicha secuencia de interés de acuerdo con la invención es independiente de elementos transgénicos del genoma nuclear.

Definiciones

3'-UTR:	región transcrita pero no traducida de un (>) <i>gen</i> , cadena abajo de una (>) <i>región codificante</i> ;
5'-UTR:	región transcrita pero no traducida de un (>) <i>gen</i> , cadena arriba de una (>) <i>región codificante</i> ; en (>) <i>genes</i> (>) <i>plastidiales</i> , la 5'-UTR contiene información de secuencia para iniciar la traducción (sitio de unión al ribosoma) (>) <i>RBS</i> próximo a su extremo 3';
aadA:	(>) <i>región codificante</i> de la aminoglicósido adenil transferasa bacteriana, una proteína frecuentemente usada, que detoxifica (>) <i>inhibidores de selección</i> con los antibióticos espectinomycin y/o estreptomycin;
activador:	proteína que se une a una secuencia operadora y por lo tanto activa la transcripción;
aphA-6:	(>) <i>región codificante</i> de la aminoglicósido fosfotransferasa A-6 bacteriana, una proteína que detoxifica el (>) <i>inhibidor de selección</i> con el antibiótico kanamicina
cloroplasto:	(>) <i>plasto</i> que contiene clorofila;
región codificante:	secuencia de nucleótidos que contiene la información para a) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o b) los nucleótidos de un ARN funcional; las regiones codificantes están opcionalmente interrumpidas por uno o más (>) <i>intrones</i> ;
región o secuencia flanqueante:	secuencias de ADN en los extremos 5' y 3' de insertos en un (>) <i>vector de transformación plastidial</i> , que median la integración en el (>) <i>plastoma</i> diana de secuencias entre las secuencias flanqueantes por doble (>) <i>recombinación homóloga</i> recíproca. Mediante el mismo mecanismo, las secuencias pueden modificarse o eliminarse del (>) <i>plastoma</i> diana. De esta manera, las secuencias flanqueantes del (>) <i>vector de transformación</i> (>) <i>plastidial</i> determinan dónde se generan cambios en el (>) <i>plastoma</i> diana por (>) <i>transformación</i> .
expresión génica:	proceso que convierte la información de secuencia en función; en (>) <i>genes</i> que codifican polipéptidos, la expresión génica requiere la actividad de un (>) <i>promotor</i> , que inicia y dirige la actividad de una ARN polimerasa, conduciendo a la formación de un ARN mensajero, que posteriormente se traduce en un polipéptido; en (>) <i>genes</i> que codifican ARN, la actividad de la ARN polimerasa mediada por un (>) <i>promotor</i> genera el ARN codificado;
gen o genes:	secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican todos los elementos, que se requieren para asegurar una función, por ejemplo, la expresión; los genes se organizan en (>) <i>operones</i> , que contienen al menos una (>) <i>región codificante</i> completa; en (>) <i>genes</i> que codifican polipéptidos, estos elementos son: (1) un (>) <i>promotor</i> , (2) una región no traducida 5' ((>) 5'-UTR), (3) una (>) <i>región codificante</i> completa, (4) una región no traducida 3' ((>) 3'-UTR); en (>) <i>genes</i> que codifican ARN, faltan la (>) 5'-UTR y la (>) 3'-UTR; en (>) <i>operones</i> que consisten en más de una (>) <i>región codificante</i> , dos (>) <i>regiones codificantes</i> completas posteriores están separadas por un (>) <i>espaciador</i> y los elementos (>) <i>promotor</i> , (>) 5'-UTR y (>) 3'-UTR están compartidas por las (>) <i>regiones de codificación</i> de ese (>) <i>operón</i> ;
genoma:	secuencia de ADN completa de un núcleo de una célula o de un orgánulo celular;
GFP:	proteína verde fluorescente
recombinación homóloga:	proceso que conduce al intercambio, inserción o delección de secuencias debido a la presencia de (>) <i>secuencias flanqueantes</i> con suficiente homología de secuencia con un sitio diana en un (>) <i>genoma</i> ;
secuencia heteróloga:	una secuencia que no aparece en plastos, preferiblemente en el genoma completo (orgánulo y nuclear), de la planta usada en el proceso de la invención antes de que los plastos se transformen con dicha secuencia.
intrón:	secuencia que interrumpe una (>) <i>región codificante</i> ;

ES 2 324 787 T3

	operador:	secuencia de nucleótidos que sirve como un sitio de unión para una proteína reguladora;
5	operón:	estructura organizativa de varios (>) <i>genes</i> que comparten un promotor;
10	planta o plantas:	organismo (u organismos) que contienen (>) <i>plastos</i> en sus células; las plantas pueden ser multicelulares o unicelulares; esta invención se refiere particularmente a (>) <i>plantas</i> multicelulares; estas incluyen el grupo de gimnospermas (tales como pino, píceas y abeto etc.) y angiospermas (tales como los cultivos monocotiledóneos de maíz, trigo, cebada, arroz, centeno, triticale, sorgo, caña de azúcar, espárrago, ajo, palmera etc. y monocotiledóneas no de cultivo, y los cultivos dicotiledóneos de tabaco, patata, tomate semilla de colza, remolacha azucarera, calabaza, pepino, melón, pimiento, especies de Citrus, berenjena, uvas, girasol, soja, alfalfa, algodón, etc.), y dicotiledóneas no de cultivo, así como helechos, hepáticas, musgos y algas verdes, rojas y marrones multicelulares; son ejemplos de plantas unicelulares <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Spirulina</i> ;
20	plasto o plastos:	orgánulo u orgánulos con su propia maquinaria genética en células (>) <i>vegetales</i> , que aparecen en diversas formas funcional y morfológicamente diferentes, por ejemplo amiloplastos, (>) <i>cloroplastos</i> , cromoplastos, etioplastos, gerontoplastos, leucoplastos etc;
	plastoma:	secuencia de ADN completa del (>) <i>plasto</i> ;
25	promotor:	secuencia de nucleótidos funcional que inicia y regula la transcripción;
30	RBS, sitio de unión al ribosoma:	elemento de secuenciación de ADN cadena arriba del (>) <i>codón de inicio de la traducción</i> de una (>) <i>región codificante</i> , que media la unión al ribosoma y el inicio de la traducción del ARN transcrito respectivo; elementos <i>RBS</i> son parte de las (>) 5'-UTR o de los (>) <i>espaciadores</i> ;
	represor:	proteína que se une a una secuencia operadora e interfiere por tanto con la transcripción;
35	aptámero de ARN:	secuencia de ARN cuya estructura secundaria puede variar tras la unión a un sustrato;
	inhibidor de selección:	compuesto químico, que reduce el crecimiento y desarrollo de células u orgánulos no transformados más fuertemente que el de los transformados;
40	secuencia de interés:	secuencia modificada o recién introducida de cualquier longitud: el propósito un intento de (>) <i>transformación</i> ; si no se desea introducir una secuencia, la longitud de la secuencia de interés puede ser cero, es decir, puede ser de interés no tener una secuencia de interés;
45	terminación:	en la descripción de esta invención, el término “terminación” se refiere a la interrupción de la transcripción del ARN a partir de una secuencia de ADN;
	terminador:	elemento de secuencia responsable de la (->) <i>terminación</i> ;
50	secuencia reguladora de la transcripción:	una secuencia de ADN implicada en la transcripción de una secuencia unida operativamente (por ejemplo, de dicha secuencia de interés);
55	vector de transformación:	molécula de ADN clonada que se generó para mediar la (>) <i>transformación</i> de un (>) <i>genoma</i> ;
	transformación:	proceso que conduce a la introducción, la escisión o la modificación de secuencias de ADN por tratamiento de (>) <i>plantas</i> o células vegetales, incluyendo el uso de al menos un (>) <i>vector de transformación</i> ;
60	secuencia reguladora de la traducción:	una secuencia de ARN implicada en la traducción de una secuencia unida operativamente (por ejemplo, de dicha secuencia de interés (transcrita));
	transgén:	secuencia de ADN obtenida de un (>) <i>genoma</i> , introducida en otro;
65	uidA:	(>) <i>región codificante</i> de la β -glucuronidasa bacteriana, una proteína indicadora usada frecuentemente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra esquemáticamente el casete de inserción en el plasmoma del vector de transformación pICF10501 que contiene dos unidades de transcripción divergentes: el promotor *rrn16* de plastos de tabaco (16S) controla la trans-
 cripción de las secuencias codificantes de *lac* y *aphA-6*, que están precedidas por un sitio de unión al ribosoma (RBS)
 artificial de la 5'-UTR del gen *rpl22* de plastos de tabaco, respectivamente, y seguido por la 3'-UTR del gen *rbcL* de
Chlamydomonas reinhardtii. La secuencia codificante de smGFP proporcionada con la 5'-UTR del gen 10 del bacte-
 riófago T7 y la 3'-UTR del gen *rpl32* de plastos de tabaco, se transcribe a partir de un promotor de *rrn16* modificado
 que contiene una secuencia operadora *lac* (16Slac). El casete de inserción está flanqueado por secuencias de ADN
 de plastos de tabaco para recombinación homóloga, conduciendo a la inserción en el plasmoma entre los genes *trnV* y
3'rps12.

Figura 2

Detección inmunológica de la expresión de GFP tras la inducción con IPTG

A) Se analizará para determinar su contenido de GFP mediante transferencia de Western el transformante plastidial
 557-1 que contenía el gen de smGFP bajo el control del promotor 16S-lac3 y el gen *lacI* (vector de transformación
 pICF1050-1). Para la muestra no inducida (-), se retiró una hoja joven de una planta de aproximadamente 7 cm de
 altura antes de pulverizar la planta con una solución de IPTG 1 mM. Para la muestra inducida (+), se cortó la siguiente
 hoja más joven cuatro días después de la pulverización. La cantidad de proteína soluble total cargada en el gel se
 muestra la parte superior de los carriles.

B) Se cargaron en el gel cantidades inferiores de proteína de la muestra inducida mostrada en A para permitir la
 cuantificación en comparación con la muestra no inducida. Además, se cargó proteína de hojas adicionales que se
 cortaron siete días después de la pulverización. La hoja a era la siguiente hoja más joven, la hoja b una hoja más vieja.
 Comparada con un patrón de GFP, la cantidad de GFP en el primer carril está en el intervalo de 15 a 20 ng.

La figura 3 ilustra el principio del control de la traducción usado por Isaacs *et al.*, (2004) y en el ejemplo 7. En la
 parte superior, se muestra una 5'-UTR que tiene auto-complementariedad que conduce a la formación de una estructura
 tallo-bucle, por lo que el sitio de unión al ribosoma (RBS) se incluye en dicha estructura tallo-bucle. La estructura tallo-
 bucle impide el acceso de ribosomas al sitio de unión al ribosoma (RBS), por lo que no puede traducirse una secuencia
 de interés codificada, digamos ARNm. Un segmento de dicha 5'-UTR (línea en negrita) del ARNm a regular tiene
 complementariedad de secuencia con un ARN activador (un ARN que actúa en trans de la invención). En presencia
 de dicho ARN activador (parte inferior), dicho tallo-bucle se resolvía debido a la formación de un híbrido con el ARN
 activador, por lo que dicho RBS se expone para interacción con ribosomas, permitiendo el inicio de la traducción. El
 ARN activador se expresa a partir de un promotor inducible.

La figura 4 proporciona una representación esquemática del principio del control de la traducción usado en el
 ejemplo 8. El ARN que actúa en trans se transcribe a partir de un promotor constitutivo de ADN plastidial bicatenario
 (parte superior). El ARN que actúa en trans tiene complementariedad con un segmento de un ARN regulador de la
 traducción de un ARNm y puede formar un híbrido mostrado en la parte inferior. El híbrido bloquea el codón AUG y
 el RBS del ARN regulador de la traducción, por lo que se impide la traducción. Si se induce la transcripción a partir
 del promotor inducible mediante una señal de control aplicada externamente, se transcribe un ARN complementario
 a dicho ARN que actúa en trans, por lo que dicho ARN que actúa en trans se elimina por formación de un híbrido (no
 se muestra). Como resultado, el codón AUG y el RBS del ARNm quedan expuestos para la unión del ribosoma. De
 manera alternativa, la transcripción del ARN que actúa en trans puede controlarse mediante un promotor inverso que
 puede ser inducible.

Descripción detallada de la invención

Esta invención describe entre otros un proceso de control de la expresión de una secuencia de interés codificada
 por el plasmoma en plantas transplastómicas. El control de la expresión génica puede implicar una molécula reguladora
 (particularmente una proteína reguladora) que puede unirse a un elemento regulador unido operativamente a dicha
 secuencia de interés (por ejemplo situado fuera o dentro de dicha secuencia de interés). Son ejemplos de dicha molécula
 reguladora una proteína represora, cuya unión evita o impide la transcripción de dicha secuencia de interés, o una
 proteína activadora, cuya unión permite o aumenta la transcripción de dicha secuencia de interés. Son otros ejemplos
 proteínas que se unen al ARNm de dicha secuencia de interés y regulan la traducción. Un ejemplo adicional es una
 ARN polimerasa que transcribe específicamente dicha secuencia de interés. Otros ejemplos de moléculas reguladoras
 son factores de procesamiento o de corte y empalme de ARN específicos. Además, la molécula reguladora también
 puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ARN que impide la expresión de la secuencia de interés
 por interacción con su ARNm. Dicha molécula reguladora puede ser propiamente dicha señal de control; de manera
 alternativa, ciertas propiedades de dicha molécula reguladora pueden cambiarse en respuesta a dicha señal aplicada
 externamente, por lo que se controla la expresión de dicha secuencia de interés.

En una realización general de esta invención, la unión de dicha molécula reguladora puede modificarse mediante dicha señal química o mediante dicha señal física (tal como temperatura o luz). Son ejemplos de dichas moléculas reguladoras cuyas propiedades pueden cambiarse mediante una señal química proteínas represoras y activadoras conocidas de sistemas de regulación bacterianos como se describen a continuación. Cuando se usa tal sistema de control, la proteína reguladora puede estar codificada en el plasto y puede expresarse de manera constitutiva, pero ciertas propiedades (por ejemplo propiedades de unión) pueden cambiarse en plastos mediante dicha señal aplicada externamente, que permite el control de la expresión de la secuencia de interés.

En una realización adicional de esta invención, dicha molécula reguladora es dicha señal de control. El control de la expresión de la secuencia de interés puede lograrse por cultivo de la planta o células vegetales en ausencia de la molécula reguladora y la molécula reguladora se aplica externamente a dicha planta o células vegetales como dicha señal en un momento deseado. Esto puede conseguirse mediante la aplicación externa directa de la molécula reguladora a la planta, o aplicando externamente un ácido nucleico que codifica dicha molécula reguladora, por ejemplo, por infección con un virus de plantas modificado (un vector viral).

Preferentemente, la proteína reguladora procede de un organismo procariota. Se han descrito numerosos ejemplos de proteínas reguladoras en procariotas que pueden usarse para el control de la expresión génica en plastos como se describe en esta invención. Son ejemplos de proteínas represoras químicamente regulables de sistemas procariotas el represor LacI de *Escherichia coli* o el represor TetR del transposón tn10 (Hillen y Berens, 1994). En ambos casos, el promotor de la secuencia de interés se proporciona con elementos de secuencia corta (elementos operadores) que son sitios de unión para la proteína represora. La unión de la proteína represora al operador impide la transcripción de la secuencia de interés regulada. En presencia de un inductor químico aplicado externamente, la afinidad de la proteína represora con el operador se reduce, de modo que puede desarrollarse la transcripción de la secuencia de interés. Son ejemplos de inductores químicos la lactosa o el isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) que interaccionan con LacI, tetraciclina o anhidrotetraciclina que interaccionan con TetR, arabinosa para el promotor de P_{BAD} . En una realización preferida de esta invención, la secuencia operadora se integra en el plastoma dentro o cerca del promotor de la secuencia de interés a controlar, y la proteína represora también debería estar codificada en el plastoma para que se exprese constitutivamente en una cantidad suficiente para evitar o impedir la expresión de la secuencia de interés. La expresión puede inducirse después mediante la aplicación externa de dicha señal química que actúa como un inductor químico en un momento deseado.

Un modo adicional de control de la expresión de dicha secuencia de interés es mediante proteínas activadoras. Son ejemplos de proteínas activadoras en sistemas procariotas el activador de MaIT de *Escherichia coli* (Schlegel *et al.*, 2002) o el activador de LuxR de *Vibrio fischeri* (Dunlap, 1999). A diferencia de las proteínas represoras, las proteínas activadoras no impiden, sino que activan la transcripción cuando se unen a secuencias operadoras por interacción con la maquinaria de transcripción. Ambas proteínas activadoras mencionadas anteriormente requieren la presencia de un inductor químico como dicha señal química para presentar actividad de unión: MaIT se activa mediante maltosa, LuxR mediante lactona N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina. Estas sustancias pueden usarse por lo tanto también como señales químicas para inducir la expresión de dicha secuencia de interés en plastos proporcionadas con elementos de regulación apropiados de una manera similar a la descrita anteriormente para proteínas represoras.

En una realización adicional de esta invención, también puede usarse el sistema descrito para desactivar o disminuir la expresión de una secuencia de interés. Esto puede desearse cuando se requiere el producto génico de dicha secuencia de interés durante el crecimiento de la planta (por ejemplo resistencia a herbicidas) pero no se desea en el producto final (por ejemplo en la planta recolectada). La desactivación de la expresión puede conseguirse por ejemplo mediante el cultivo de la planta en presencia de un inductor químico que se deja fuera cuando ya no se desea la expresión. Además, la expresión de una proteína represora para la secuencia de interés a controlar puede activarse.

De esta manera, tanto la aplicación de dicha señal de control como la interrupción de la aplicación de dicha señal de control pueden usarse para controlar la expresión de dicha secuencia de interés.

La invención no se limita al control de una sola secuencia de interés. También pueden controlarse operones que contienen varias secuencias codificantes. Si se controla la transcripción del operón, la expresión de todas las secuencias codificantes puede regularse de la misma manera, lo que puede desearse si van a expresarse varias enzimas de una ruta biosintética. De manera alternativa, pueden regularse por separado varias secuencias codificantes, usando, por ejemplo, una combinación de sistemas de control que responden a diferentes inductores químicos.

Control traduccional sobre la expresión de la secuencia de interés

El control sobre la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma en una planta o en células vegetales puede conseguirse mediante el control traduccional sobre dicha secuencia de interés. Puede conseguirse un control traduccional por ejemplo regulando el acceso de un sitio de unión al ribosoma (RBS) a ribosomas. El acceso del RBS a ribosomas puede alterarse secuestrando o exponiendo el RBS en un ARN regulador de la traducción (dicho ARN regulador de la traducción puede ser una 5'-UTR) unida operativamente a dicha secuencia de interés. El secuestro o la exposición del RBS pueden conseguirse regulando la estructura secundaria de dicho ARN regulador de la traducción cerca del RBS. Para regular la estructura secundaria de dicho ARN regulador de la traducción pueden usarse dos principios básicos. Ambos principios dependen de cambios reversibles de la estructura secundaria del ARN (y opcionalmente de la estructura terciaria).

Un principio se basa en un ARN regulador de la traducción (por ejemplo, secuencias 5'-UTR) que contiene un aptámero de ARN próximo al RBS. La unión de una señal de control química por dicho aptámero de ARN puede modificar el acceso del RBS a ribosomas.

5 Otro principio se basa en secuestrar o exponer el RBS en la 5'-UTR usando secuencias represoras complementarias. Dichas secuencias represoras pueden proporcionarse o en dicho propio ARN regulador de la traducción (en cis) o en un ARN que actúa en trans (en trans). En el caso de represión en cis, las secuencias complementarias intramoleculares pueden formar una estructura tallo-bucle que puede resolverse de manera reversible mediante un ARN que actúa en trans (dicho ARN que actúa en trans descrito por Isaacs *et al.*, 2004) mediante la formación de un híbrido intermolecular alternativo. En el caso de represión en trans, el híbrido de ARN de represión intermolecular (híbrido de ARN que actúa en trans y un segmento de la 5'-UTR) puede resolverse de manera reversible mediante la formación de un híbrido intermolecular alternativo con una molécula de ARN adicional, o suprimiendo la expresión del represor. De esta manera, puede usarse un ARN que actúa en trans para suprimir la traducción o para activar la traducción.

15 La traducción de dicha secuencia de interés puede regularse mediante el uso de elementos ribointerruptores que normalmente se localizan en la 5'-UTR del ARNm. Tras la unión de una señal química a dicho elemento ribointerruptor, puede inducirse un cambio conformacional en dicho ARNm, que puede inducir o reprimir la activación de la traducción permitiendo o impidiendo el acceso del ribosoma a la 5'-UTR. La unión de dicha señal química al elemento ribointerruptor puede suceder directa o indirectamente. En el caso de unión directa dicha molécula de señal está unida por un elemento de ARN mediante un aptámero (Soukup y Breaker, 1999) de la 5'-UTR. En el caso de unión indirecta, dicha molécula de señal está unida mediante un factor proteico.

25 *Control traduccional de la expresión de la secuencia de interés por interacción de una señal química aplicada externamente con un ARN regulador de la traducción (5'-UTR)*

Dicha planta o dichas células vegetales pueden contener un ácido nucleico recombinante en el genoma plastidial, por lo que dicho ácido nucleico recombinante

30 - comprende dicha secuencia de interés y

- codifica un ARN regulador de la traducción unido operativamente a dicha secuencia de interés, adaptándose dicho ARN regulador de la traducción para la interacción con dicha señal química, por lo que la traducción de dicha secuencia de interés se controla mediante dicha interacción. En esta realización, dicho ARN regulador de la traducción es el componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos.

40 Después de la transcripción de dicho ácido nucleico recombinante, se forma un transcrito de ARNm que contiene dicho ARN regulador de la traducción y la secuencia de interés transcrita. Dicho ARN regulador de la traducción puede ser una región 5'-no traducida (5'-UTR) y preferiblemente contiene elementos necesarios para la traducción de la secuencia de interés. Estos son elementos típicamente contenidos en una 5'-UTR de un gen plastidial como un sitio de unión al ribosoma (RBS). Dicho ARN regulador de la traducción se localiza típicamente cadena arriba de dicha secuencia de interés y está unido operativamente a dicha secuencia de interés para traducir dicha secuencia de interés.

45 Dicho ARN regulador de la traducción puede contener adicionalmente un segmento adaptado para la interacción con una señal química aplicada externamente, preferiblemente una señal química molecular pequeña no proteica. Dicho segmento puede ser un aptámero de ARN que esté adaptado para unirse a dicha señal química. En ausencia de la señal química, el aptámero de ARN puede asumir una estructura secundaria que permite el acceso del RBS a ribosomas, por lo que es posible la traducción de la secuencia de interés. En presencia de dicha señal química, dicho aptámero de ARN se une a dicha señal química, por lo que el aptámero de ARN asume una estructura secundaria que secuestra el RBS de manera que no es posible la traducción.

50 Los aptámeros de ARN son moléculas de ARN cuya secuencia se diseña o se selecciona para que sea posible una unión estrecha y específica con un compañero de unión predeterminado. Se han identificado aptámeros de ARN que se unen a proteínas como enzimas (por ejemplo Rusconi *et al.*, 2004, Jellinek *et al.*, 1994) o a compañeros de unión moleculares pequeños como teofilina (Suess *et al.*, 2004), el cofactor FAD (Roychowdhury-Saha *et al.*, 2002), FMN (Winkler *et al.*, 2002), o adenina libre (Meli *et al.*, 2002). Para una revisión véase Famulok y Mayer, 1999. Pueden identificarse aptámeros de ARN con alta especificidad por moléculas diana usando el proceso SELEX (Tuerk and Gold, 1990).

60 En *B. subtilis* se demostró que la traducción de una secuencia de ARNm puede regularse usando una fusión de un aptámero con una secuencia cadena abajo que contiene un RBS (Suess *et al.* 2004). Se descubrió que la traducción de un ARNm plastidial recombinante puede regularse fusionando un aptámero de ARN (capaz de unirse a una señal de control predeterminada aplicada externamente) con un RBS artificial. La interacción del complejo de dicha señal química y dicho aptámero de ARN con el RBS puede conducir a una estimulación de la traducción. De manera alternativa, la interacción del complejo de dicha señal química y dicho aptámero de ARN con el RBS también puede conducir a un efecto inhibitorio sobre la traducción.

El control de la expresión génica en plastos mediante la regulación de la traducción puede aplicarse independientemente o en combinación con una regulación a nivel de transcripción. Esto último tiene la ventaja de potenciar el efecto regulador, que es se prefiere. En esta realización preferida la señal química aplicada externamente puede interaccionar con dos o más componentes diferentes de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos de un modo sinérgico. Como ejemplo, dicha señal química puede interaccionar con una proteína reguladora (como el represor lac) y un aptámero de ARN. La interacción de dicha molécula de señal aplicada externamente con una proteína reguladora puede conducir a una activación de la transcripción. La interacción de la misma molécula de señal aplicada externamente con un aptámero de ARN puede estimular la traducción permitiendo el acceso de los RBS secuestrados previamente a ribosomas.

Los ejemplos de señales químicas aplicadas externamente adaptadas para la interacción con dos o más componentes diferentes de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos a nivel de traducción incluyen: lactosa, derivados de lactosa, otros hidratos de carbono, tetraciclina, antibióticos de diversas clases, herbicidas, esteroides, nutrientes, proteínas o fuentes de las mismas, ácidos nucleicos o fuentes de los mismos.

Control traduccional de la expresión de una secuencia de interés controlando la disponibilidad de un ARN que actúa en trans que tiene complementariedad con un segmento del ARN regulador de la traducción de dicha secuencia de interés

Dicha planta o dichas células vegetales pueden contener en el genoma plastidial un ácido nucleico recombinante, por lo que dicho ácido nucleico recombinante

- comprende dicha secuencia de interés y

- codifica un ARN regulador de la traducción unido operativamente a dicha secuencia de interés, teniendo dicho ARN regulador de la traducción un segmento de secuencia complementario a un segmento de secuencia de un ARN que actúa en trans, por lo que la disponibilidad de dicho ARN que actúa en trans puede controlarse mediante una interacción de dicha señal de control con un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de proteínas de plastos.

Dicho ARN que actúa en trans actúa en trans con dicho ARN regulador de la traducción, por lo que es posible el emparejamiento de bases debido a dicha complementariedad. Dicho ARN que actúa en trans se expresa en plastos a partir de una secuencia del plastoma, preferentemente heteróloga. Dicho ARN que actúa en trans se expresa preferentemente independientemente de dicha secuencia de interés. A menos que se indique de manera diferente, dicho ARN regulador de la traducción se corresponde con el definido en el capítulo anterior.

Dicho ARN regulador de la traducción puede tener una auto-complementariedad cerca de su sitio de unión al ribosoma (RBS), preferiblemente una complementariedad del RBS, para permitir la formación de una estructura tallo-bucle que implica a dicho RBS, secuestrando a dicho RBS. De esta manera, la traducción de dicha secuencia de interés puede impedirse en ausencia de dicho ARN que actúa en trans. En presencia de dicho ARN que actúa en trans, dicha estructura tallo-bucle en dicho ARN regulador de la traducción puede resolverse por emparejamiento de bases entre dicho ARN que actúa en trans y dicho segmento de secuencia complementaria de dicho ARN regulador de la traducción, conduciendo a la exposición del RBS y a la traducción de la secuencia de interés.

De manera alternativa, dicho ARN regulador de la traducción no tiene una auto-complementariedad, pero la formación de un híbrido entre un ARN que actúa en trans y un segmento de secuencia de dicho ARN regulador de la traducción permite el bloqueo del RBS. En esta realización, la presencia de dicho ARN que actúa en trans suprime la traducción de dicha secuencia de interés. La eliminación de dicho ARN que actúa en trans por un ARN adicional que tiene complementariedad con dicho ARN que actúa en trans conduce a un RBS expuesto, por lo que se hace posible la traducción de dicha secuencia de interés. En esta realización, el control de dicho proceso es posible por interacción de una señal de control aplicada externamente con un componente intraplastidial implicado en la transcripción de dicho ARN que actúa en trans o de dicho ARN adicional.

Se ha demostrado que es posible controlar la traducción mediante el uso de estructuras secundarias alternativas de ARN, que aparecen como una consecuencia de hibridaciones de ácidos nucleicos alternativas intramoleculares o intermoleculares (Isaacs *et al.*, 2004, incorporado como referencia en este documento). Se ha descubierto que la traducción de un ARNm plastidial puede regularse aplicando externamente a dicha planta o a dichas células vegetales una señal de control que controle la disponibilidad de un ARN que actúa en trans mediante una interacción con un componente intraplastidial de la maquinaria de traducción de plastos. La traducción de dicha secuencia de interés a partir de su ARNm se controla a su vez por la interacción entre dicho ARN que actúa en trans y dicho ARN regulador de la traducción que está unido operativamente a dicha secuencia de interés. La fuente de dicho ARN que actúa en trans puede ser también una unidad de transcripción de plastos. La transcripción de dicho ARN que actúa en trans puede controlarse aplicando externamente a dicha planta o a dichas células vegetales una señal de control, en la que dicha señal de control está adaptada para una interacción con un componente intraplastidial de la maquinaria de expresión de genes de plastos (por ejemplo el sistema lactosa/represor lac/operador lac).

Las plantas o células vegetales que pueden utilizarse para esta realización pueden obtenerse transformando el genoma plastidial con al menos una construcción que contiene una 5'-UTR modificada artificialmente por ingeniería genética unida operativamente a dicha secuencia de interés, siendo capaz dicha 5'-UTR de emparejamiento de bases y de formación de un híbrido con dicho ARN que actúa en trans. La 5'-UTR modificada artificialmente por ingeniería genética para esta realización debe ser capaz de formar al menos las siguientes estructuras secundarias alternativas (i) y (ii) como una consecuencia de formación de híbridos alternativa.

(i) formación de un híbrido interno (intramolecular), en dicha 5'-UTR, como una estructura tallo-bucle que conduce a un bloqueo del RBS, por lo que ya no es posible la interacción del RBS con ribosomas.

(ii) formación de un híbrido intermolecular entre un ARN que actúa en trans y una parte de la secuencia de dicha estructura tallo-bucle. El híbrido intermolecular puede liberar el RBS previamente secuestrado, por lo que puede hacerse posible el inicio de la traducción.

Para liberar eficazmente el RBS previamente secuestrado, el híbrido intermolecular entre el ARN que actúa en trans y el ARNm a regular debería ser más firme que el híbrido intermolecular alternativo. Adicionalmente, la secuencia complementaria al RBS en el ARN que actúa en trans debería estar enmascarada, puesto que de otra manera podría producirse una titulación anormal de ribosomas. El enmascaramiento de esta secuencia puede conseguirse mediante el uso de una secuencia complementaria adicional en dicho ARN que actúa en trans conduciendo a la formación de un híbrido interno (véase Isaac *et al.*, 2004). Sin embargo, el híbrido interno en dicho ARN que actúa en trans debería ser más débil comparado con el híbrido que puede formarse con dicho ARNm a regular. Además el ARN que actúa en trans debe ser capaz de resolver el híbrido intermolecular entre la 5'-UTR del ARNm a regular. Esto puede conseguirse mediante un elemento de secuencia corta en el ARN que actúa en trans que sea complementario a la estructura de bucle dentro del ARNm a regular (Isaac *et al.*, 2004)

El sistema descrito anteriormente para controlar la traducción de una secuencia de interés puede aplicarse en combinación con un control a nivel de transcripción. Esto último tiene la ventaja de aumentar el efecto regulador. En una realización preferida, la molécula de señal aplicada externamente interacciona con diferentes componentes de la maquinaria de expresión de genes de plastos de un modo sinérgico: por ejemplo un promotor y un RBS. La interacción de dicha señal aplicada externamente con un promotor puede conducir a la activación de la transcripción. La interacción de dicha molécula de señal aplicada externamente con la 5'-UTR conduce a una estimulación de la traducción liberando el acceso del sitio de unión al ribosoma previamente secuestrado al ribosoma.

El uso de dicho ARN que actúa en trans como se describe en este documento puede aplicarse a la regulación simultánea de varios operones. En este caso, la regulación de la expresión de transgenes de plastos puede conseguirse aplicando externamente a dicha planta o a dichas células vegetales una señal de control física o química o una fuente de la misma, en la que dicha señal de control está adaptada para una interacción con un componente intraplastidial de la maquinaria de traducción de plastos. Dicha interacción puede conducir a la activación (o represión) de transcritos, que pueden regular simultáneamente otros transcritos recombinantes a nivel de traducción, produciendo redes reguladoras complejas.

En otra realización de la invención (véase el ejemplo 8), el ARN que actúa en trans se genera para inhibir la traducción del ARNm a regular. El ARN que actúa en trans puede expresarse a partir de un promotor constitutivo. La represión del ARNm a regular puede funcionar por emparejamiento de bases entre un elemento de secuencia (antisentido) del ARN que actúa en trans y el RBS en la 5'-UTR del ARNm a regular, impidiendo de esta manera la interacción adecuada del RBS y el ribosoma. La activación de la traducción puede conseguirse expresando un segundo ARN (sentido) que neutraliza el ARN que actúa en trans mediante formación de híbridos. La unión entre el ARN que actúa en trans y el segundo ARN (sentido) debe ser más fuerte que la unión entre el ARN que actúa en trans y el RBS del ARNm a regular. De manera alternativa, la traducción del ARNm a regular puede conseguirse suprimiendo la expresión del ARN que actúa en trans.

La transcripción de dicha secuencia de interés y la transcripción de dicho ARN que actúa en trans puede controlarse por las mismas o por diferentes señales de control aplicadas externamente. Dicho ARN que actúa en trans puede expresarse a partir de la misma o de una unidad de transcripción diferente que dicha secuencia de interés. La expresión de la misma unidad de transcripción puede usarse para reforzar el efecto regulador de la inducción o represión. La expresión de unidades de transcripción diferentes puede usarse para construir redes reguladoras artificiales. Dicho ARN que actúa en trans puede originarse a partir de una unidad de transcripción de plastos que está bajo el control de una señal química aplicada externamente o física aplicada externamente.

El proceso y las plantas de la invención permiten la producción de sustancias que son tóxicas para las plantas

La transformación plastidial se usa a menudo como un método para producir sustancias, particularmente proteínas de interés, en elevadas cantidades, haciendo uso de la elevada dosificación génica en estos orgánulos que porta el potencial de niveles de expresión extremadamente elevados de transgenes. Existe un amplio intervalo de sustancias, desde proteínas farmacéuticas hasta enzimas técnicas, que pueden producirse en plastos. Además, también pueden usarse plastos para la producción de sustancias no proteicas como biopolímeros mediante la expresión de enzimas que sintetizan estas sustancias a partir de metabolitos de plastos. Sin embargo, como los plastos son esenciales para

el desarrollo de la planta, la producción de sustancias extrañas interfiere frecuentemente con la función normal de los plastos. Esta invención ofrece un medio para producir sustancias extrañas que son nocivos para los plastos suprimiendo o no activando su expresión durante el desarrollo de la planta. La expresión del producto puede inducirse en un momento deseado, por ejemplo poco antes de la recolección de las plantas. Un método preferido para esta invención es controlar la expresión de la secuencia de interés usando una proteína represora que responde a una señal de inducción, y un promotor que contiene una secuencia operadora. La secuencia de interés puede introducirse en el plastoma cadena abajo de dicho promotor que contiene la secuencia operadora. Este promotor puede ser un promotor de plastos modificado, o un promotor procariota que contiene la secuencia operadora. La secuencia operadora puede estar presente dentro de la secuencia promotora o en sus proximidades, por ejemplo en el punto de inicio de la transcripción y pueden estar presentes varios sitios operadores. La secuencia que codifica la proteína represora se inserta preferiblemente en el plastoma en una unidad de transcripción diferente de modo que se expresa constitutivamente y está presente en una cantidad suficiente para suprimir la transcripción de la secuencia de interés controlada mediante la unión a la secuencia operadora. La expresión de la secuencia de interés controlada puede inducirse proporcionando a la planta dicha señal de control que reduce la unión de la proteína represora y por tanto permite la transcripción. La señal de control puede proporcionarse directamente a la planta, por ejemplo por pulverización, o indirectamente, por ejemplo proporcionando una sustancia que se metaboliza por la planta, por lo que se produce la señal de inducción. Como alternativa, la señal de control puede ser una señal endógena de la planta, por ejemplo cuando se desencadenan cambios en el desarrollo tales como la maduración del fruto. Puede usarse una proteína reguladora influenciada por una señal de desarrollo de este tipo para inducir o suprimir la expresión de una secuencia plastidial de interés en el momento del cambio en el desarrollo.

Algunos productos génicos de dicha secuencia de interés pueden ser nocivos para las plantas cuando se producen en elevadas cantidades, mientras que un bajo nivel del producto no interfiere con el desarrollo normal de la planta. Para estos productos, puede ser suficiente disminuir la transcripción hasta un nivel tolerable; esto puede conseguirse usando sistemas de represor/operador convencionales como el sistema de represión lac de *E. coli*, que normalmente permite una expresión de fondo significativa. En general, será más fácil obtener un elevado nivel de expresión después de la inducción si se tolera un cierto nivel de expresión de fondo. Si se requiere una mayor represión, es decir para productos que son nocivos incluso en pequeñas cantidades, pueden combinarse sistemas de control diferentes, por ejemplo pueden insertarse varios sitios operadores o pueden usarse varias proteínas represoras diferentes.

El proceso y las plantas de la invención permiten la producción de plantas transplastómicas que muestran una salud vegetal y una capacidad de crecimiento normales

Incluso si el producto génico de una secuencia de interés no es tóxico para las plantas, puede ser deseable controlar la expresión de la secuencia de interés. Cuando un producto se expresa en elevadas cantidades en plastos -deseándose esto en la mayoría de los casos- la expresión génica consume una cantidad de energía y metabolitos considerable, que puede conducir a un crecimiento retardado de la planta. Cuando la expresión de la secuencia de interés se reduce a un nivel limitado usando el proceso descrito en esta invención, las plantas pueden usar sus recursos para un crecimiento y desarrollo normales.

El proceso y las plantas de la invención permiten la construcción de vectores que contienen secuencias que son tóxicas para bacterias

Los vectores para transformación plastidial se construyen normalmente en bacterias, principalmente en *E. coli*. Los elementos reguladores de plastos a menudo se reconocen en bacterias de manera que una secuencia de interés bajo el control de dichos elementos reguladores puede expresarse en cierta medida en el hospedador de clonación. Esto puede conducir a problemas si una secuencia de interés o su producto de expresión son tóxicos para el hospedador de clonación, y en algunos casos los clones deseados no pueden clonarse en bacterias en absoluto. La invención que se describe en este documento permite controlar la expresión tanto en plastos como en el hospedador de clonación bacteriano usando elementos de control en vectores de transformación plastidial que también se reconocen en el hospedador de clonación. De esta manera, los productos tóxicos para *E. coli* pueden clonarse en *E. coli* en vectores de expresión en plastos.

Diversos mecanismos de regulación conocidos de sistemas procariotas pueden adaptarse para el uso en esta invención

La maquinaria de expresión de genes de plastos es similar en algunos aspectos a la de los organismos procariotas: por ejemplo, la traducción se media por ribosomas 70S y la transcripción está mediada por ARN polimerasas de tipo *E. coli* y de tipo bacteriófago. Por lo tanto, pueden usarse mecanismos de regulación para la expresión génica conocidos de organismos procariotas en plastos para el control de expresión de acuerdo con esta invención transfiriendo los elementos reguladores a plastos. A continuación (ejemplo 1) se proporciona un ejemplo de la invención, en el que el sistema de represor/operador lac de *E. coli* se transfirió a plastos del tabaco: en el ejemplo 1, el represor lac se expresa constitutivamente a partir del plastoma del tabaco y obstaculiza la transcripción de un gen de GFP codificado por el plastoma que está bajo el control de un promotor modificado que contiene un sitio operador lac. La expresión puede activarse por tratamiento de la planta con el inductor químico IPTG que se une al represor lac y reduce su afinidad con el sitio operador. De manera similar, pueden establecerse sistemas de regulación correspondientes en los plastos

con otros sistemas represores o activadores conocidos de organismos procariotas. Además, para crear sistemas de regulación más complejos en plastos, pueden combinarse componentes de diferentes sistemas, también con elementos de regulación endógenos de plastos. Un ejemplo de esto es la combinación de un sistema polimerasa/promotor específico, tal como un sistema polimerasa/promotor de T7 con un sistema represor como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo adicional es la generación de proteínas de fusión que comprenden componentes de unión a ADN y reguladores derivados de sistemas de regulación diferentes. Con este enfoque, la función original de una proteína reguladora puede cambiarse, por ejemplo una proteína originariamente funcional como un represor puede cambiarse a un activador transcripcional mediante fusión con un dominio adecuado, como se hizo con el represor tet para su aplicación en sistemas eucariotas (revisado en Berens y Hillen, 2003). Al revés, una proteína de unión a ADN originariamente activa como un activador transcripcional puede cambiarse a un represor colocando su secuencia operadora en un promotor. Como muestran los ejemplos anteriores, pueden usarse componentes de sistemas de regulación de eucariotas.

Puede conseguirse una regulación adicional aplicando la proteína señal externamente, por ejemplo, mediante transfección viral

En esta realización, la planta puede cultivarse en ausencia de la proteína señal hasta una fase de crecimiento deseada. Cuando se desee la inducción o represión de la secuencia de interés, la proteína señal puede aplicarse externamente como dicha señal de control de la invención. Una posibilidad para proporcionar la proteína señal es mediante transfección viral de la planta con un virus modificado genéticamente que codifica la proteína señal, preferiblemente en combinación con una señal de dirección a plastos. Otras posibilidades incluyen infiltración con otros vectores modificados genéticamente como el plásmido Ti de *Agrobacterium*, suministro de proteína mediado por *Agrobacterium*, o infiltración directa con una proteína reguladora o un ácido nucleico que la codifique. Una ventaja de este método de regulación es que la proteína señal no puede causar efectos indeseados en otros genes plastidiales durante el crecimiento de la planta. Además, este método no conduce a la integración estable del ácido nucleico aplicado externamente que codifica la proteína señal en el material hereditario de la planta, siendo ventajoso para la seguridad biológica.

En analogía con las aplicaciones descritas anteriormente, la represión de la expresión de una secuencia de interés puede conseguirse proporcionando una proteína represora, mientras que la inducción de una secuencia de interés puede conseguirse proporcionando una proteína activadora. Un modo más complejo para la inducción de una secuencia de interés puede ser proporcionar una proteína represora que impida la expresión de una segunda proteína represora que controle la transcripción de dicha secuencia de interés. Para esta aplicación de la invención, se usan preferiblemente proteínas reguladoras que no cambian su actividad dependiendo de señales externas como inductores. Dichas proteínas reguladoras que muestran actividad constitutiva se han caracterizado como versiones mutadas o modificadas de muchas proteínas represoras o activadoras bacterianas reguladas químicamente. Cuando se usan proteínas reguladoras con actividad constitutiva, no es necesaria la aplicación de un inductor químico.

En el ejemplo 5 se proporciona un ejemplo para esta invención usando la aplicación externa de la proteína señal. En este caso, la regulación se basa en la interacción entre la ARN polimerasa del bacteriófago T7 con un promotor correspondiente. La secuencia de interés (*uidA*) está codificada por el plasmoma bajo el control de un promotor específico de T7 de manera que para la transcripción es necesaria la ARN polimerasa correspondiente. La expresión de la secuencia de interés puede inducirse proporcionando la ARN polimerasa de T7 como dicha señal química mediante inoculación de la planta o células vegetales con un vector viral de plantas modificado que codifica la polimerasa de T7. La expresión de la polimerasa de T7 a partir del ARN viral puede estar mediada por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) derivado de un virus de plantas (crTMV) (Ivanov *et al.*, 1997, Skulachev *et al.*, 1999; documentos WO9854342; WO0320927; WO0320928). La polimerasa se fusiona preferiblemente a un péptido de dirección a plastos de modo que se importe al interior de los plastos donde puede mediar la transcripción a partir del promotor de T7. En este ejemplo, la construcción viral se integra en un vector binario y puede por tanto aplicarse mediante infiltración de las plantas transplastómicas con un *Agrobacterium* que contiene este vector. Como se ha indicado anteriormente, son posibles otros modos de aplicación de la polimerasa. La aplicación externa de la polimerasa aumenta la rigurosidad del control comparado con la inducción de una polimerasa codificada por el núcleo, ya que puede no haber expresión en el estado no inducido. Además, la secuencia de interés no puede transmitirse mediante el polen, que sería el caso con un gen de polimerasa codificado por el núcleo. Por lo tanto, este método de inducción es ventajoso para la bioseguridad.

Aplicación externa de dicha proteína señal a partir de una composición sin células (suministro directo)

Pueden usarse diferentes métodos para el suministro directo de dicha proteína señal (por ejemplo, la polimerasa de T7) al interior de células de dicha planta. Entre los más simples está el suministro directo con la ayuda de interacción mecánica con el tejido vegetal. Por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles de partículas recubiertas con polipéptido puede suministrar dicho polipéptido al interior de la célula vegetal. El protocolo puede ser similar a los descritos para el suministro de ADN en protocolos de transformación de plantas (documentos US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). Sin embargo, en lugar de ADN, puede usarse dicha proteína señal para recubrir las partículas. Existe una descripción de un proceso biolístico que usa métodos de recubrimiento de partículas que son razonablemente cuidadosos para preservar la actividad de dicho polipéptido (Sanford, Smith y Russell, 1993, *Methods in Enzymol.*, 217, 483-509). En principio, también pueden usarse otros métodos de transformación de plantas por ejemplo, microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), o suministro mediado por liposomas (para una revisión véase: Fraley y Papahadiopoulos, 1982, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 96, 171-191).

Además, dicha proteína señal aplicada externamente puede aplicarse a partir de una composición sin células a dicha planta o dichas células vegetales. En este caso, dicha proteína señal preferiblemente comprende una secuencia de translocación de membrana (MTS), que permite la entrada de dicha proteína señal en las células de dicha planta. Dicha MTS puede unirse covalentemente o no covalentemente a dicha proteína señal. Preferiblemente, está unida covalentemente a dicha proteína señal. Dicha MTS puede ser un péptido que dota a dicha proteína señal de la capacidad para atravesar la membrana plasmática de las células de dicho organismo. En la técnica se conocen muchas de tales MTS. Frecuentemente, comprenden varios aminoácidos básicos, particularmente argininas. El tamaño de las MTS puede variar en gran medida, sin embargo, pueden tener típicamente de 3 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 50 a 60 aminoácidos. Típicamente la MTS se incluye en la proteína señal en su extremo N-terminal. Dicha proteína señal puede producirse mediante técnicas de expresión de proteína convencionales, por ejemplo, en *E. coli*. La purificación de dicha proteína señal después de su expresión se realiza preferiblemente, eliminando particularmente los ácidos nucleicos que codifican dicha proteína señal para la seguridad biológica. Dicha proteína señal puede aplicarse a una planta, por ejemplo, pulverizando dicha planta con una composición líquida, preferiblemente una solución acuosa, que contiene dicha proteína señal. Preferiblemente, se toman medidas para facilitar la entrada de dicha proteína señal en las células de dicha planta, particularmente medidas que permiten atravesar la pared celular vegetal y/o la capa vegetal externa. Un ejemplo de tales medidas es lesionar levemente partes de la superficie de la planta por ejemplo por raspado mecánico. Otro ejemplo es el uso de enzimas que degradan la celulosa en dicha composición sin células para debilitar o perforar la pared celular vegetal.

Se conocen en la técnica muchos ejemplos de MTS, naturales y sintéticas. Una MTS puede ser una repetición de un sólo aminoácido, por ejemplo un péptido catiónico que contiene once argininas RRRRRRRRRRRR (Matsushita *et al.*, 2001, *J. Neurosci.*, 21, 6000-6007). Otra MTS catiónica es un transportador de 27 aminoácidos de longitud (GWTLSAGYL LGKINLKALA ALAKKIL) (Pooga *et al.*, 1998, *FASEB J.*, 12, 67-77). Es muy probable que tales péptidos, para su penetración en la célula, aprovechen la asimetría de la membrana plasmática celular donde la monocapa lipídica orientada hacia el citoplasma contiene fosfolípidos aniónicos (Buckland y Wilton, 2000, *Biochim. Biophys. Acta/Mol. Cell. Biol. Of Lipids*, 1483, 199-216). Muchas proteínas contienen subunidades que permiten su translocación activa a través de la membrana plasmática en las células. Son ejemplos de tales subunidades el dominio básico de HIV-1 Tat₄₉₋₅₇ (RKKRRQRRR) (Wender *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13003-13008), Antennapedia₄₃₋₅₈ (RQIKIWFQNR RMKWKK) (Derossi *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 10444-10450), la MTS del factor de crecimiento fibroblástico de Kaposi (AAVALLPAVL LALLAP) (Lin *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 14255-14258); la MTS de VP22 (Bennet, Dulby y Guy, 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20, 20; Lai *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11297-302); homeodominios de las proteínas Fushi-tarazu y Engrailed de *Drosophila melanogaster* (Han *et al.*, 2000, *Mol Cells* 10, 728-732). Se demostró que todas estas MTS cargadas positivamente eran capaces de lograr la entrada en la célula por sí mismas y como fusiones con otras proteínas como GFP (Zhao *et al.* 2001, *J. Immunol. Methds*, 254, 137-145, Han *et al.* 2000, *Mol Cells*, 10, 728-732), recombinasa Cre (Peitz *et al.* 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4489-4494) de una manera independiente de energía. Sin embargo, la fusión no se requiere necesariamente para el transporte de proteínas al interior de la célula. Se diseñó un transportador peptídico de 21 restos Pep-1 (KETWWETWWTEWSQPKKRKV) que es capaz de formar complejos por medio de interacciones hidrófobas no covalentes con diferentes tipos de proteínas, como GFP, b-Gal o anticuerpos específicos de longitud completa. Estos complejos son capaces de penetrar eficazmente en las membranas celulares (Morris, *et al.* 2001, *Nature Biotechnol.*, 19, 1173-1176). La lista de MTS puede continuarse y, en general, cualquier péptido rico en arginina de origen natural o sintético puede proporcionar la proteína señal de la invención con la capacidad para entrar en células vegetales (Futaki *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 5836-5840).

45 Aplicación externa de dicha proteína señal usando patógenos de plantas

Adicionalmente, dicha proteína señal puede aplicarse externamente a dicha planta usando un microorganismo patógeno que tenga un sistema para suministrar una proteína como la proteína señal de la invención al interior de una célula hospedadora. Dicha proteína señal puede estar codificada de forma expresable en ácidos nucleicos de dicho microorganismo patógeno, de manera que dicha proteína señal puede suministrarse al interior de una célula de dicha planta. Un ejemplo preferido de un microorganismo patógeno de este tipo es un *Agrobacterium* virulento o no virulento, en el que, por razones de seguridad biológica, dicha proteína señal preferiblemente no está codificada en el ADN-T de un plásmido Ti del *Agrobacterium* bioleado. Son ejemplos adicionales de microorganismos fitopatógenos Bordetella, Erwinia, Pseudomonas, Xantomonas, Yersinia cuyos sistemas de secreción pueden usarse para la presente invención. Pueden encontrarse ejemplos para el uso de los sistemas de secreción de Yersinia tipo III en el documento WO9952563.

Muchas bacterias patógenas de plantas y animales usan sistemas de secreción especializados para suministrar proteínas al interior de las células hospedadoras. Son ejemplos de tales sistemas secretores el sistema de secreción de tipo III de bacterias gram-negativas (Binet *et al.* 1997, *Gene*, 192, 7-11; Thanassi y Hultgren, 2000, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 420-430; Buttner y Bonas, 2002, *Trends Microbiol.*, 10, 186-192; Buttner y Bonas, 2003, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 321-319) y el sistema secretor de tipo II de proteobacterias (Sandkwist, 2001, *Mol. Microbiol* 40, 271-283). Se describen múltiples rutas de secreción de proteínas a partir de bacterias en la revisión de Thanassi y Hultgren (2000, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 420-430). Pueden usarse sistemas de secreción de tipo III de diferentes bacterias fitopatógenas para suministrar una proteína al interior de la célula vegetal. Se clonó el grupo de genes de Hrp (secreción de proteína de tipo III) a partir de *Erwinia chrysanthemi* (Ham *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10206-10211); son ejemplos adicionales el sistema de secreción de *Pseudomonas syringae* (para una revisión véase Jin *et*

al., 2003, *Microbes Infect.*, 5, 301-310), y el sistema secretor de *Xanthomonas campestris* (Marois *et al.*, 2002, *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 15, 637-646; Szurek *et al.*, 2002, *Mol. Microbiol.*, 46, 13-23).

Los patógenos de plantas (fitopatógenos) deberían modificarse preferiblemente por ingeniería genética para ser capaces de transferir la proteína de interés sin causar efectos nocivos graves en la planta hospedadora. Además, pueden modificarse por ingeniería genética bacterias no patógenas de manera que tengan la parte del sistema de secreción de tipo III necesaria para el suministro de una proteína de interés en la célula vegetal, pero no otras partes que dañen a la planta hospedadora.

Entre los patógenos de plantas, las agrobacterias son las más adecuadas para la presente invención. Los documentos *Science* (2000) 290, 979-982 y WO0189283 demuestran la posibilidad de transferencia mediada por *Agrobacterium* de recombinasa Cre como una proteína heteróloga a células hospedadoras. La transferencia se consiguió usando una fusión traduccional de Cre con proteínas de virulencia o sus partes implicadas en la translocación de proteínas al interior de la célula vegetal durante el contacto con *Agrobacterium*. El suministro de recombinasa Cre no estaba acoplado con transferencia de ADN que codifica dicha recombinasa pero era lo bastante eficaz para desencadenar acontecimientos de recombinación en células diana modificadas por ingeniería genética. El proceso de suministro de polipéptidos mediado por bacterias en células vegetales requiere la disponibilidad de células bacterianas modificadas por ingeniería genética que llevan el gen de dicha proteína (documento WO0189283). Un proceso de este tipo es lo bastante eficaz para desencadenar cambios seleccionables en células vegetales en cultivos celulares. En los documentos PCT/EP03/13016, PCT/EP03/13018 y PCT/EP03/13021 se describen mejoras de éstos métodos.

Los procesos y plantas de la invención minimizan el riesgo de captación no deseada de sustancias producidas en las plantas transgénicas y aumentan por lo tanto la bioseguridad

La producción de proteínas recombinantes en plantas transgénicas ofrece ventajas sustanciales en comparación con el aislamiento de las proteínas de fuentes naturales o usando tecnología de fermentación. Las proteínas farmacéuticas aisladas a partir de material animal o humano pueden estar contaminadas con organismos patógenos copurificados, virus o priones. Por el contrario, no se conoce que las plantas contengan ningún componente patógeno en humanos. Comparada con las tecnologías de fermentación, se espera que la producción de proteínas en plantas sea mucho más económica y pueda aumentarse a escala fácilmente usando la infraestructura agrícola existente. Las plataformas de producción de proteína vegetal permiten la producción de proteínas para la salud humana o animal, aditivos alimentarios, proteínas técnicas o enzimas técnicas, etc. Sin embargo, la producción de campo a gran escala de plantas transgénicas conlleva un riesgo intrínseco de contaminación cruzada con productos agrícolas destinados para la cadena alimentaria. Son posibles razones para una contaminación cruzada la mezcla de semillas, el mantenimiento de plantas transgénicas de periodos de vegetación antiguos en campos que se usan posteriormente para plantas no MG (Fox, 2003), o transferencia no deseada de polen a cultivos no MG que crecen en las proximidades.

Es una tarea principal aplicar los esquemas de contención consiguientes para cultivos MG, especialmente para los que contienen sustancias que pueden ser nocivas si se incorporan de una manera incontrolada o que no están destinadas para el consumo, sobre el ciclo de producción completo. Impedir la polinización cruzada es un medio para la contención de cultivos MG. Además, sería deseable tener plantas MG que no contengan el producto recombinante a menos que se induzca la expresión del producto.

El proceso de la presente invención combina ambos requisitos para la producción segura de proteínas en plantas transgénicas. Usando transformantes plastidiales, la transferencia de polen de la secuencia o secuencias de interés a cultivos de tipo silvestre se reduce enormemente o se excluye en la mayoría de las especies, ya que los plastos se heredan principalmente por vía materna. Todos los componentes del sistema, que controlan la expresión génica en plastos, se localizan en el plastoma. Esto contrasta con el único otro método conocido de inducción de la expresión génica en plastos que se basa en la importación de una polimerasa de T7 codificada por el núcleo. Además, usando el proceso de esta invención, es posible generar plantas transplastómicas que no contengan la proteína recombinante de interés a menos que se haya inducido la producción. Las plantas transgénicas sin ninguna proteína potencialmente nociva pueden cultivarse en ausencia de la señal aplicada externamente, impidiendo de esta manera una captación indeseada de la sustancia por animales o seres humanos. La expresión puede inducirse después directamente antes de la recolección o incluso después de la recolección en un entorno seguro.

Usando la presente invención, la mezcla indeseada de plantas MG con cultivos no MG ya sea a nivel de semilla o por persistencia accidental de plantas transgénicas de periodos de vegetación antiguos no conduce a ningún riesgo para la salud humana o animal, ya que estas plantas no entran en contacto con la señal inductora aplicada externamente y por lo tanto no expresan el producto o productos recombinantes.

Esta solicitud de patente reivindica la prioridad de la solicitud de patente internacional PCT/EP03/13656, presentada el 3 de diciembre del 2003, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Ejemplo 1

*Control de la expresión de GFP en plastos de tabaco usando el sistema de represor/operador lac**Construcción de vector de transformación plastidial pICF10501*

Se amplificó por PCR la secuencia codificante de *lacI* de la cepa XL1-Blue de *E. coli* con los cebadores olac1 (5'-gaccatggaaccagtaacgttatacga-3') y olac2 (5'-cactgcagtcactgccgcgtttccag-3'), añadiendo un sitio de restricción NcoI y PstI en los extremos. La secuencia codificante se fusionó con el promotor de *rrn16* de plastos por inserción en los sitios de restricción correspondientes del vector pkCZ (Zou *et al.*, 2003), sustituyendo la secuencia codificante de *aadA*, dando como resultado el plásmido pICF9851. Se generó una versión modificada del promotor de *rrn16* que contenía un sitio operador lac entre las cajas -10 y -35 por PCR inversa con los cebadores olac3 (5'-acgattgtgagcgga taacaatattttctgtggagcggaac-3') y olac4 (5'-caatcccacgagcctcttacc-3') del plásmido pICF7341 que contiene la secuencia promotora clonada amplificada por PCR del ADN del tabaco. El promotor modificado se escindió del plásmido resultante con SalI y BamHI. Se escindió del plásmido pICF9141 con BamHI y SacII un fragmento adicional que consistía en la secuencia codificante de smGFP de pSMGFP4 (David y Vierstra 1998) flanqueada por la secuencia no traducida 5' del gen 10 del bacteriófago T7 y la secuencia no traducida 3' del gen plastidial *rpl32* (amplificado por PCR a partir de ADN del tabaco). Ambos fragmentos se ligaron entre sí en el plásmido pICF9851 con XhoI y SacII de restricción para que se obtuvieran dos unidades de transcripción divergentes (GFP controlada por el promotor de *rrn16* modificado por lac y *lacI* controlado por el promotor de *rrn16* no modificado). Se escindió un fragmento que contenía estas unidades de transcripción con SphI y XhoI y se insertó después de la generación de extremos romos de los extremos protuberantes con ADN polimerasa de T4 en el sitio de restricción SdaI de extremos romos del plásmido pICF9561, que contiene el marcador de selección de *aphA-6* (Huang *et al.*, 2002) proporcionado con señales de expresión en plastos (5'-UTR del *rpl22* plastidial del tabaco, 3'-UTR de *rbcL* de *Chlamydomonas reinhardtii*) y secuencias flanqueantes homólogas para recombinación con el plastoma (amplificadas por PCR a partir de ADN del tabaco). El sitio de inserción del plastoma diana para este vector (pICF10501) está entre los genes *trnV* (GAC) y *3'rps12* del plastoma del tabaco. En la figura 1 se proporciona una representación esquemática de la disposición de genes en pICF10501.

Generación de transformantes plastidiales del tabaco

Se esterilizaron superficialmente semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. petite havana) (1 min en etanol al 70%, 10 min en Dimanin C al 5%, Bayer, Leverkusen, Alemania), se lavaron 3 veces durante 10 min en H₂O estéril y se pusieron en medio con SCN (Dovzhenko *et al.*, 1998). Las plantas se cultivaron a 25°C en un ciclo de 16 h de luz/8 h de oscuridad (0,5-1 W/m², bombillas fluorescentes Osram L85W/25 Universal-White). El aislamiento de protoplastos se realizó de acuerdo con Dovzhenko *et al.* (1998). La transformación se realizó usando polietilenglicol (PEG) como se describe en Koop *et al.* (1996), y embebimiento en alginato de acuerdo con Dovzhenko *et al.* (1998). Después de una semana de cultivo en medio líquido, se transfirieron las células a medio con RMOP solidificado con agar (Svab *et al.*, 1990) que contenía kanamicina 25 µg/ml para seleccionar transformantes. Después de 3-8 semanas se recuperaron las plantas regeneradas verdes y se transfirieron a placas individuales. Para conseguir homoplasma, las líneas individuales se sometieron a ciclos repetidos de generación de vástagos cortando pequeños trozos de hojas que forman nuevas plantas regeneradas en medio con RMOP con kanamicina 15 µg/ml. El enraizamiento de las plantas regeneradas seleccionadas se realizó en medio con SCN que contenía espectinomicina 15 µg/ml. La transformación plastidial se confirmó por análisis molecular de las plantas regeneradas (PCR y análisis Southern de acuerdo con métodos convencionales).

Inducción química de la expresión de transgenes

Se cultivó una planta transplastómica generada con pICF10501 en medio con SCN hasta una altura de aproximadamente 7 cm. Se cortó una hoja joven (de aproximadamente 4 cm de longitud) y se eliminó para análisis, y se pulverizó la planta con aproximadamente 1 ml de una solución de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Después de cuatro y siete días, respectivamente, se cortó la siguiente hoja más joven y también se analizó. Se extrajo la proteína soluble total con Na₂CO₃ 50 mM, pH 9,6, PMSF 2 mM. La cuantificación de proteína se realizó de acuerdo con el método de Bradford con solución RotiQuant. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se detectó inmunológicamente la GFP usando el método de ECL (anticuerpo primario dirigido contra una proteína recombinante que se corresponde con la GFP de *A. victoria*; Santa Cruz Biotechnology). Como se muestra en la figura 2, la cantidad de GFP en las hojas había aumentado aproximadamente 10 veces después de cuatro, y siete días después de la pulverización podía observarse un aumento adicional. El aumento en contenido de GFP se correspondía con un aumento en la fluorescencia verde de las hojas cuando se irradiaban con luz ultravioleta/azul.

Ejemplo 2

Transformación plastidial de Solanum tuberosum usando el sistema de represor/operador lac

Además del tabaco, el sistema de control génico descrito en esta invención puede usarse también con otras especies de cultivo tales como patata (*Solanum tuberosum*). Este ejemplo ilustra la transformación plastidial eficaz en la patata después del bombardeo de partículas de microcolonias derivadas de protoplastos usando el vector descrito en el Ejemplo 1. Debido al alto grado de homología entre los plastomas del tabaco y la patata, los vectores que contienen secuencias flanqueantes del tabaco también puede usarse para el tabaco.

Se cultivaron *in vitro* plantas de *S. tuberosum* cv. Walli como cultivos de vástagos estériles ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 h día, intensidad lumínica $75 \pm 10 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$). Cada 2 meses se iniciaron nuevos cultivos transfiriendo ápices de vástagos (de aproximadamente 2 cm de longitud) a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) en tubos de vidrio (2,5 x 20 cm.). Se seleccionaron hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas de 3-4 semanas de edad y se usaron para aislamiento de protoplastos. Se cortaron las hojas en tiras de 1 mm con un bisturí y se preplasmolizaron en 10 ml de medio MMM-550. El medio MMM-550 contiene $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,066 g/l, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) 1,952 g/l y manitol 86 g/l (ajustado a 550 mOsm y pH 5,8). Después de 1 hora de incubación en la oscuridad, el MMM-550 se retiró y se sustituyó por 10 ml de medio MMS-550 que contenía Macerozima R10 al 0,4% p/v y Celulasa R10 al 0,4%. El medio MMS-550 contiene $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,066 g/l, MES 1,952 g/l y sacarosa 150 g/l (ajustado a 550 mOsm y pH 5,8). Los explantes foliares se incuban en solución enzimática durante 16 horas en la oscuridad a 25°C sin agitación. Al día siguiente, la digestión se filtra a través de un tamiz de $100 \mu\text{m}$ en un tubo de centrifuga y después se cubre cuidadosamente con 2 ml de medio MMM-550 y se centrifuga (10 min, $70 \times g$). Se recogen los protoplastos intactos de la banda de la interfaz y se lavan una vez resuspendiéndolos en 10 ml de medio de cultivo de protoplastos de patata seguido de centrifugación (10 min, $50 \times g$). El medio de cultivo de protoplastos contiene NH_4Cl 133,75 mg/l, KNO_3 950 mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 220 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185 mg/l, KH_2PO_4 85 mg/l, microelementos B5 (Gamborg *et al.* 1968), MS Fe-EDTA (Murashige y Skoog, 1962), mio-inositol 100 mg/l, glutamina 100 mg/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, clorhidrato de tiamina 10 mg/l, clorhidrato de piridoxina 1 mg/l, xilosa 250 mg/l, MES 975 mg/l, ácido naftalenacético (NAA) 2 mg/l, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 0,2 mg/l, 6-bencilaminopurina (BAP) 0,5 mg/l y glucosa 94 g/l (ajustado a 550 mOsm y pH 5,8). Los protoplastos se cuentan y se resuspenden a $2 \times$ la densidad de siembra en placa final necesaria en medio de cultivo de protoplastos ($2,0 \times 10^5/\text{ml}$) y se mezclan con un volumen igual de ácido algínico al 1,2% p/v preparado en medio MMM-550. Se realizó un cultivo en capa fina de alginato en rejillas de polipropileno como se describe en Dovzhenko *et al.* (1998). Después de la solidificación de la matriz de alginato, las rejillas se cultivan en placas de Petri de 5 cm que contienen 2 ml de medio de cultivo de protoplastos. Se incuban los protoplastos durante un día en la oscuridad ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y después se transfieren a condiciones de sala de cultivo convencionales para un desarrollo adicional ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 h día, intensidad lumínica $75 \pm 10 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$).

De 12 a 15 días después del embebimiento, las rejillas que contienen microcolonias de patata (aproximadamente 8 células) se transfieren a placas de 9 cm que contienen medio SH-1 solidificado con Gelrite al 0,4% p/v. El medio SH-1 contiene NH_4Cl 267,5 mg/l, KNO_3 1900 mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/l, KH_2PO_4 170 mg/l, microelementos MS y Fe-EDTA (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas de Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969), sulfato de adenina, 40 mg/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l, MES 975 mg/l, NAA 0,1 mg/l, BAP 0,5 mg/l, sacarosa 10 g/l y manitol 50 g/l (ajustado a pH 5,8). Dos días después de la siembra en placas en medio sólido, las colonias derivadas de protoplastos se bombardearon con alícuotas de oro cargadas con $25 \mu\text{g}$ de vector pICF10501 (véase el ejemplo 1) usando las condiciones de recubrimiento y bombardeo de partículas descritas en Mühlbauer *et al.* (2002). La selección de los transformantes se basa en la resistencia al antibiótico kanamicina conferida por el producto génico de *aphA-6*. Un día después del bombardeo, se transfieren las rejillas a placas que contienen medio SH-1 solidificado con Gelrite + kanamicina 25 mg/l y se subcultivan cada 3 semanas en placas de selección recién preparadas. Las colonias resistentes se transfieren a placas de 5 cm que contienen medio SH-1 + kanamicina 15 mg/l. Para la regeneración, los callos (de aproximadamente 5 mm de diámetro) se transfieren a medio SH-2 solidificado con Gelrite al 0,4% p/v que contiene kanamicina 15 mg/l. El medio SH-2 es idéntico al medio SH-1 (véase anteriormente) excepto por que el NAA se sustituye por ácido indol-3-acético 0,1 mg/l (IAA), el BAP se sustituye por zeatina 1 mg/l y el contenido en manitol se reduce de 50 g/l a 36 g/l. Los vástagos se retiran de los callos en regeneración después de 6-8 semanas de cultivo en medio SH2 y se transfieren a medio MS sin antibiótico para enraizamiento y desarrollo adicional. El análisis de transformantes, la inducción con IPTG y la determinación inmunológica del contenido de GFP se realizan como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Control de la expresión de GFP en plastos de tabaco usando el sistema de represor/operador tet (Ejemplo de Referencia)

Se generan plantas de tabaco transplastómicas que contienen una expresión génica de GFP recombinante que puede inducirse con tetraciclina o anhidrotetraciclina por transformación con el vector pICF10461. La composición general del vector de transformación plastidial pICF10461 se corresponde con el vector pICF10501 (descrito en el ejemplo 1 y mostrado en la figura 1), pero en lugar de la secuencia codificante de *lacI* se inserta la secuencia codificante de *tetR* del transposón *tn10* y el promotor de *rrn16* modificado para el gen de GFP contiene una secuencia operadora tet en lugar de un operador lac. La amplificación por PCR de la secuencia tetR de *E. coli* XL1-Blue se realiza con los cebadores otet1 (5'-gaccatggctagatagataaaaagtaaag-3') y otet2 (5'-cactgcagttaagaccacatttcacatttaag-3'), y la modificación del promotor

de *rrn16* del tabaco por PCR inversa con los cebadores otet3 (5'-acgtccctatcagtgatagatatttctgggagcgaac-3') y otet4 (5'-caatcccacgagcctcttate-3'). El procedimiento de clonación se realiza de forma análoga al vector pICF10501, por lo que todos los demás elementos reguladores, marcador de selección y sitio de inserción en el plasmoma son idénticos.

La generación de transformantes plastidiales del tabaco se realiza como se describe en el ejemplo 1. La inducción de la expresión de GFP se realiza pulverizando las plantas con solución de anhidrotetracilina (200 ng/ml). La determinación inmunológica del contenido de GFP se realiza como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4

Control de la expresión de GFP en plastos de tabaco usando el activador LuxR (Ejemplo de Referencia)

En este ejemplo, el control de la expresión de un gen de GFP recombinante en plastos de tabaco está mediado por la proteína activadora de la transcripción LuxR de *Vibrio fischeri* (Dunlap, 1999). La secuencia codificante de GFP se integra en el plasmoma bajo el control de un promotor de *rrn16* modificado que contiene un sitio de unión de 20 pb para LuxR (caja lux) centrada alrededor del nucleótido -42 desde el inicio de la transcripción. Mediante esta modificación, el elemento -35 original y la secuencia inmediatamente cadena arriba del mismo que es esencial para la función del promotor (Suzuki *et al.*, 2003) se destruyen, de manera que el promotor no es activo en plastos. La secuencia codificante de *luxR* también se integra en el plasmoma en un operón divergente bajo el control de un promotor *rrn16* no modificado, confiriendo una expresión constitutiva de la proteína LuxR. Para mostrar actividad activadora de la transcripción en el promotor modificado, la proteína LuxR requiere la presencia de un inductor químico (VAI: N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona). De esta manera, el tratamiento de las plantas transplastómicas con el inductor químico activa la expresión de GFP.

La construcción de un vector de transformación plastidial se hace en analogía a la construcción del vector de transformación descrito en el ejemplo 1, excepto por que se usa la secuencia codificante de *luxR* en lugar de la secuencia codificante de *lacI*, y la secuencia codificante de GFP se pone bajo el control del promotor de *rrn16* modificado descrito en este ejemplo. La generación de transformantes plastidiales del tabaco se realiza como se describe en el ejemplo 1. La inducción de la expresión de GFP se realiza tratando plantas transplastómicas con N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona. La determinación inmunológica del contenido de GFP se realiza como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 5

Inducción de un transgén de plastos por una ARN polimerasa suministrada por virus (Ejemplo de Referencia)

Generación de transformantes plastidiales del tabaco que contienen el gen uidA controlado por el promotor de T7

El vector pICF10571 contiene un casete de inserción en el plasmoma que contiene dos unidades de transcripción divergentes: el marcador de selección de *aadA* se controla mediante el promotor de *rrn16* de plastos del tabaco, un sitio de unión al ribosoma artificial, y la 3'-UTR del gen *rbcl* de *Chlamydomonas reinhardtii*, y por lo tanto se expresa constitutivamente en plastos, confiriendo resistencia a espectinomicina y estreptomicina. El gen indicador *uidA* que codifica la β -glucuronidasa (GUS) está controlado por el promotor y la 5'-UTR del bacteriófago T7. Las unidades de transcripción están flanqueadas por secuencias de ADN plastidial del tabaco para recombinación homóloga, conduciendo a la inserción en el plasmoma entre los genes *trnN* y *trnN*. La construcción del vector se realiza de la siguiente manera: se escinde un fragmento que contiene el promotor y la 5'-UTR de T7 del plásmido pET28a+ (Novagen) con BglII y NcoI. Con NcoI y SacII se escinde un fragmento que consiste en la secuencia codificante de *uidA* y la 3'-UTR del gen *rbcl* del tabaco de un plásmido descrito en Eibl *et al.* (1999). Ambos fragmentos se ligan en un vector de transformación pKZ digerido por restricción con BglII y SacII (Zou *et al.*, 2003) que contiene el marcador de selección y las secuencias flanqueantes del ADN plastidial. La generación de transformantes plastidiales del tabaco se realiza como se describe en el ejemplo 1.

Generación de una construcción viral que contiene una ARN polimerasa de T7 dirigida a plastos

Se obtuvieron ADNc del tobamovirus que infecta crucíferas (cr-TMV; Dorokhov *et al.*, 1994) y del virus de aclaramiento de las nervaduras del nabo (TVCV; Lartey *et al.*, 1994) del Prof. Joseph Atabekov de la Universidad de Moscú, Rusia. En varias etapas de clonación se genera un vector viral que contiene la secuencia codificante de la ARN polimerasa de T7. La construcción resultante contiene en orden secuencial: un fragmento de 787 pb del promotor 2 de actina de Arabidopsis (ACT2, acceso de GenBank AB026654, de las pb 57962 a 58748), el extremo 5' del TVCV (acceso de GenBank BRU03387, de la pb 1 a 5455), un fragmento de cr-TMV (acceso de GenBank Z29370, de la pb 5457 a 5677, con la timina 5606 cambiada por citosina para eliminar el codón de inicio de la proteína de cubierta) que contiene la secuencia que actúa como un sitio interno de entrada al ribosoma (Ivanov *et al.*, 1997, Skulachev *et al.*, 1999), una secuencia sintética que codifica un péptido que media la importación de proteínas en los plastos, la secuencia codificante de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (amplificada por PCR a partir del plásmido pACT7, Grachev y Pletnev, 1984), la región no traducida 3' de cr-TMV (acceso de GenBank Z29370, de las pb 6078 a 6312) y finalmente el terminador de la nopalina sintasa (Nos). El fragmento completo se clona entre los bordes izquierdo y derecho del ADN-T de pICBV10, un vector binario derivado de CarB pBIN19. El vector resultante se transforma en la cepa GV3101 de Agrobacterium.

Inducción de la expresión de GUS en plantas de tabaco transplastómicas por agroinfiltración

La agroinfiltración de plantas transplastómicas con la construcción que contiene la ARN polimerasa de T7 se hace usando el protocolo de Yang *et al.* (2000). La extracción de proteínas del material foliar y la determinación de la actividad de GUS se realizan como se describe en Jefferson *et al.* (1998).

Ejemplo 6

Control de la traducción en plastos de tabaco usando un aptámero unido a teofilina (Ejemplo de Referencia)

En este ejemplo, la expresión de un gen de GFP recombinante en plastos de tabaco se controla a nivel de traducción usando el aptámero dependiente de teofilina descrito por Suess *et al.* (2004). Se inserta un ribointerruptor de ARN unido a teofilina en la región no traducida 5' del transgén y se une al sitio de unión al ribosoma mediante una molécula de comunicación helicoidal para la que se ha propuesto un mecanismo de deslizamiento dependiente de ligando (Suess *et al.* (2004), incorporado como referencia en este documento). En ausencia de la señal química de teofilina, se forma una estructura secundaria que inhibe la unión del ribosoma a la 5'-UTR. La unión de teofilina induce un cambio conformacional que hace accesible el sitio de unión al ribosoma

El ribointerruptor descrito en Suess *et al.* (2004) (agatgataccagccgaaagcccttgccagctctcg) se introduce mediante PCR en la secuencia no traducida 5' del gen 10 del bacteriófago T7 inmediatamente cadena arriba de la secuencia de Shine-Dalgarno (AGGAG): la secuencia se incluye en un cebador para la amplificación de un fragmento que contiene la secuencia codificante de smGFP precedida por la secuencia de Shine-Dalgarno (véase el ejemplo 1). Se amplifica un segundo fragmento de PCR que consiste en el promotor de *rrn16* del tabaco y el resto de la región no traducida 5' del gen 10 de T7 a partir del plásmido pICF7341 (véase el ejemplo 1). Ambos fragmentos se unen mediante un sitio de restricción BspMI y se insertan en el plásmido pICF9561 digerido por restricción con SdaI/Ascl (véase ejemplo 1), que contiene el marcador de selección *aphA-6* y secuencias flanqueantes homólogas para recombinación con el plastoma. La generación de transformantes plastidiales del tabaco se realiza como se describe en el ejemplo 1. Después de la integración en el plastoma, un ARNm que codifica smGFP y *aphA-6* se transcribe constitutivamente a partir del promotor de *rrn16* recombinante, pero la traducción de la secuencia codificante de GFP se inhibe por la estructura secundaria en la 5'-UTR. La inducción de la expresión de GFP se realiza tratando las plantas transplastómicas con teofilina. La determinación inmunológica del contenido de GFP se realiza como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

Control simultáneo de la transcripción y traducción en plastos del tabaco mediante control lac usando un ARN activador

En este ejemplo, la regulación química de la transcripción descrita en el ejemplo 1 se combina con un mecanismo recientemente desarrollado para regular la traducción (Isaacs *et al.*, 2004), que consiste en la expresión regulada de una pequeña molécula de ARN reguladora (dicho que actúa en trans ARN de la invención) que se une a una secuencia complementaria en la 5'-UTR cadena arriba de la secuencia de interés y de este modo altera la estructura secundaria de la región no traducida 5' de manera que se posibilita la traducción. Para establecer este mecanismo de regulación, la traducción de la secuencia de interés se bloquea introduciendo una secuencia inhibidora de la traducción en la región no traducida 5' que es complementaria a la secuencia alrededor del sitio de unión al ribosoma y puede formar por lo tanto un tallo-bucle, que interfiere con la unión al ribosoma. En una unidad de transcripción diferente está codificado dicho ARN que actúa en trans que es complementario a la secuencia inhibidora de la traducción. Este pequeño ARN se dirige específicamente al tallo-bucle inhibidor, conduciendo a una estructura diferente en la que se expone el sitio de unión al ribosoma y se permite la traducción. Tanto la secuencia de interés como dicho ARN que actúa en trans se transcriben en los plastos a partir de promotores inducibles por lac, por lo que la adición de IPTG activa no sólo la transcripción de la secuencia de interés sino también su traducción por estimulación de la expresión de dicho ARN que actúa en trans.

Se construye un vector de transformación plastidial para introducir un gen de GFP regulable mediante este mecanismo basándose en el vector de transformación plastidial pICF10501 descrito en el ejemplo 1. Para sustituir la 5'-UTR del gen 10 de T7 cadena arriba de la secuencia codificante de GFP por la 5'UTR crR12 que forma un tallo-bucle descrita en Isaacs *et al.*, 2004, la secuencia codificante de GFP se amplifica por PCR con esta secuencia añadida al cebador cadena arriba oin1 (5'-ttggatccgaattctaccattcacctcttggttggttataaagaggagaaggtatagtaaggagaagaac-3') (cebador cadena abajo oin2: 5'-tatgagctcttattgtatagttcatccatgcc-3') y se inserta en el pICF10501, parcialmente digerido por restricción con BamHI y SacI. La unidad de transcripción adicional que consiste en el promotor 16Slac y el ARN regulador pequeño (taR12 descrito en Isaacs *et al.*, 2004) se añaden en el plásmido insertando un fragmento generado a partir de los oligonucleótidos sintéticos orn1 (5'-tttcggccgctcgttcaatgagaatggataaggagctcgtgggattgacgattgtgagcggataacaatatattctgggagcgaac-3') y orn2 (5'-tttcggccgctcgtatagatatggtagtagtaagttaatttcattaaccaccacaccaatcacctctggttggtgctgcccggagttcgtcccgagaatatattg-3') en el sitio de restricción XmaIII cadena abajo del operón que contiene el represor lac y el marcador de selección. La generación de transformantes plastidiales del tabaco, la inducción con IPTG y la determinación inmunológica del contenido en GFP se realizan como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 8

Control simultáneo de la transcripción y traducción en plastos del tabaco mediante control lac usando un ARN inhibidor

Como en el ejemplo 7, la expresión de GFP en plastos transformados se controla por IPTG a nivel de transcripción y traducción. El mecanismo para el control de la traducción es, sin embargo, diferente y se basa en una pequeña molécula de ARN inhibidora de la traducción (dicho ARN que actúa en trans), que es complementaria a parte de la secuencia de ARNm del gen de interés alrededor del sitio de unión al ribosoma y del codón de inicio. Este pequeño ARN se expresa a partir de un promotor constitutivo y puede hibridar con el ARNm, impidiendo así la traducción del ARNm transcrito a partir del promotor lac no inducido. Un promotor inducible por lac adicional se coloca cadena abajo de la unidad de transcripción para el ARN pequeño inhibidor de la traducción en orientación inversa para que se transcriba una cadena antisentido del ARN pequeño inhibidor de la traducción. La inducción con IPTG activa simultáneamente la transcripción de la secuencia de interés y permite su traducción suprimiendo la generación del ARN pequeño inhibidor de la traducción.

Se construye un vector de transformación plastidial para introducir un gen de GFP regulable mediante este mecanismo basándose en el vector de transformación plastidial pICF10501 descrito en el ejemplo 1. Se produce un fragmento de ADN que consiste en el promotor de *rrn16* de cloroplastos del tabaco, la secuencia de ADN para el ARN inhibidor y el promotor 16S lac inverso, mediante hibridación y relleno de los oligonucleótidos oan1 (5'-tttcggccgtcgttcaat gagaatggataagaggctcgtgggatt gacgtgagggggcagggatggctatatcttctgggagcgaacggaaatgtagccatatgtatatctcc-3' y oan2 (5'-tttcggccgcccgtcgttcaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgattgtgagcggataacaatatattctgggagcgaacggagatatacatatggctagca ttcc-3') y se inserta en el sitio de restricción de XmaIII de pICF10501 cadena abajo del operón que contiene el represor lac y el marcador de selección. La generación de transformantes plastidiales del tabaco, la inducción con IPTG y la determinación inmunológica del contenido en GFP se realizan como se describe en el ejemplo 1.

Bibliografía

- US5925806
- US20020062502
- W09854342
- Berens, C. y Hillen, W. (2003)** *Eur. J. Biochem.* 270, 3109-3121
- Davis, S.J. y Vierstra, R.D. (1998)** *Plant Mol. Biol.* 36, 521-528
- Dorokhov, Y.L., Ivanov, P.A., Novikov, V.K., Agranovsky, A.A, Morozov, S.Y., Efimov, V.A., Casper, R. y Atabekov, J.G. (1994)** *FEBS Lett.* 350, 5-8
- Dovznenko, A., Bergen, U. y Koop, H.U. (1998)** *Protoplasma* 204, 114-118
- Dunlap, P.V. (1999)** *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 5-12
- Eibl, C, Zou, Z., Beck, a., Kim, M., Mullet, J. y Koop, H.U. (1999)** *Plant J.*, 19, 333-345
- Famulok M, Mayer G Curr (1999)** *Top Microbiol Immunol* 243:123-36
- Fox, J.L. (2003)** *Nat. Biotechnol.* 21, 3-4
- Gamborg, O.L., Miller, RA y Ojima, K. (1968)** *Exp. Cell Res.* 50, 151-158
- Galvin S. B. (1998)** *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 227-232
- Grachev, MA y Pletnev, A.G. (1984)** *Bioorg. Khim.* 10, 824-843
- Gray M. W. (1991)** en: Bogorad L y Vasil I. K. (eds.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Volumen 7A, *Academic Press*, San Diego
- Heifetz, P. (2000)** *Biochimie* 82, 655-666
- Hillen, W. y Berens, C. (1994)** *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 345-369
- Huang, F.C., Klaus, S.M., Herz, S., Zou, Z., Koop, H.U. y Golds, T.J. (2002)** *Mol. Genet. Genomics*, 268, 19-27

Isaacs, F.J., Dwyer, D.J., Ding, C, Pervouchine, D.D., Cantor, C.R., y Collins, J.J. (2004) *Nature Biotechnology* 22, 841-847

Ivanov, PA, Karpova, O.V., Skulachev, M.V., Tomashevskaya, O.L., Rodionova, N.P., Dorokhov, Y.L. y Atabekov, J.G. (1997) *Virology* 232, 23-43

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987) *Embo J.*, 6, 3901-3907

Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjic N. (1994) *Biochemistry* 30:10450-6

Koop, H.U., Steinmuller, K., Wagner, H., Rossler, C, Eibl, C. y Sacher, L. (1996) *Planta*, 199, 193-201

Kuroda, H. y Maliga, P. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, 970-975

Lartey, R.T., Lane, L.C. y Melcher, U. (1994) *Arch. Virol.* 138, 287-298

Lössl, A., Eibl, C, Harloff, H.J., Jung, C. y Koop, H.U. (2003) *Plant Cell Rep*, 21, 891-899

Marechal-Drouard L, Kuntz M., Weil J. H. (1991) en: Bogorad L y Vasil I. K. (eds.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Volume 7A, *Academic Press*, San Diego

McBride, K.E., Schaaf, D.J., Daley, M. y Stalker, D.M. (1994) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305

Meli M, Vergne J, Decout JL, Maurel MC (2002) *J Biol Chem* 277:2104-11

Mühlbauer, S.K., Lössl, A., Tzekova, L, Zou, Z. y Koop, H.U. (2002) *Plant J.* 32, 175-184

Murashige, T. y Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* 15, 473-497

Nitsch, J.P. y Nitsch, C. (1969) *Science* 169, 85

Palmer J. D. (1991) en: Bogorad L. y Vasil I. K. (eds.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Volumen 7A, *Academic Press*, San Diego

Roychowdhury-Saha M, Lato SM, Shank ED, Burke DH (2002) *Biochemistry* 26:2492-9

Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G, Scardino E, Fay WP, Sullenger BA (2004) *Nat Biotechnol* 22:1423-1428

Schlegel, A., Böhm, A., Lee, S.J., Peist, R., Decker, K. y Boos, W. (2002) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 301-307

Skulachev, M.V., Ivanov, PA, Karpova, O.V., Korpela, T., Rodionova, N.P., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G. (1999) *Virology* 263, 139-154

Soukup G, Breaker R (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3584 - 3589

Staub, J.M. y Maliga, P. (1993) *Embo J.* 12, 601-606

Staub, J.M. y Maliga, P. (1995) *Plant J.* 7, 845-848

Suess, B., Fink, B., Berens, C, Stentz, R., y Hillen, W. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32, 1610-1614

Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530

Svab, Z. y Maliga, P. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 913-917 The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Nature* 408, 796-815

Tuerk C y Gold L (1990) *Science* 249:505 - 510

Winkler, Cohen-Chalamish, Breaker (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:15908 – 15913

Yang, Y., Li, R., y Qi, M. (2000) *Plant J.* 22, 543-551

Zou, Z., Eibl, C. y Koop, H.U. (2003) *Mol. Genet Genomics*, 269, 340-349

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de control de la expresión de una secuencia de interés codificada por el plastoma en una planta o en células vegetales aplicando externamente a dicha planta o a dichas células vegetales una señal de control seleccionada de lactosa o un análogo de lactosa,
en el que dicha planta o dichas células vegetales contienen en el genoma plastidial un ácido nucleico recombinante que comprende dicha secuencia de interés y, unido operativamente a la misma, un operador lac, teniendo o codificando además dicha planta o dichas células vegetales un represor lac intraplastidial.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho represor lac está codificado por dicho ácido nucleico recombinante o por un ácido nucleico recombinante adicional integrado en dicho genoma plastidial.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho control es la inducción de la expresión de dicha secuencia de interés.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho control es la supresión de la expresión de dicha secuencia de interés.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho proceso se realiza en una planta intacta o después de la recolección de dicha planta o dichas células vegetales.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho análogo de lactosa es isopropil tiogalactopiranosido (IPTG).
7. Una planta o células vegetales capaces de la expresión controlada de una secuencia de interés codificada por el plastoma, comprendiendo dicha planta o células vegetales en el genoma plastidial un ácido nucleico recombinante que comprende dicha secuencia de interés unida operativamente a un operador lac, teniendo o codificando además dicha planta o dichas células vegetales un represor lac intraplastidial.
8. Dicha planta o células vegetales de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho represor lac está codificado por una secuencia de nucleótidos heteróloga transformada en los plastos de dicha planta o dichas células vegetales.
9. Dicha planta o células vegetales de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que dicho represor lac se expresa constitutivamente en dicha planta o dichas células vegetales.
10. Un proceso para producir una planta o células vegetales transformadas en su genoma plastidial con una secuencia de interés, que comprende transformar una planta o células vegetales en su plastoma con dicha secuencia de interés unida operativamente a un operador lac y con una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un represor lac intraplastidial.
11. Un sistema para controlar la expresión de una secuencia de interés en una planta transplastómica o en células vegetales transplastómicas, que comprenden la planta o células vegetales de acuerdo con la reivindicación 7 y lactosa o un análogo de lactosa para controlar la expresión de dicha secuencia de interés en dicha planta o células vegetales.
12. Dicho sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho análogo de lactosa es isopropil tiogalactopiranosido (IPTG).

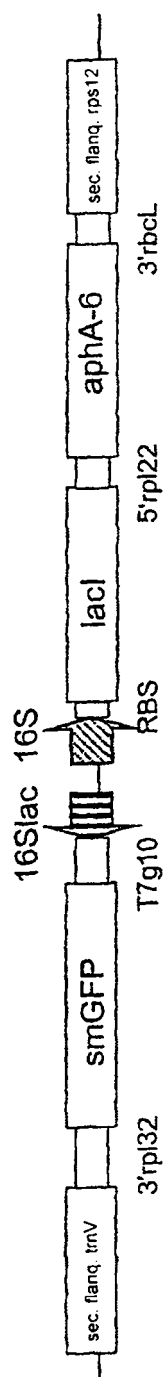


Fig. 1

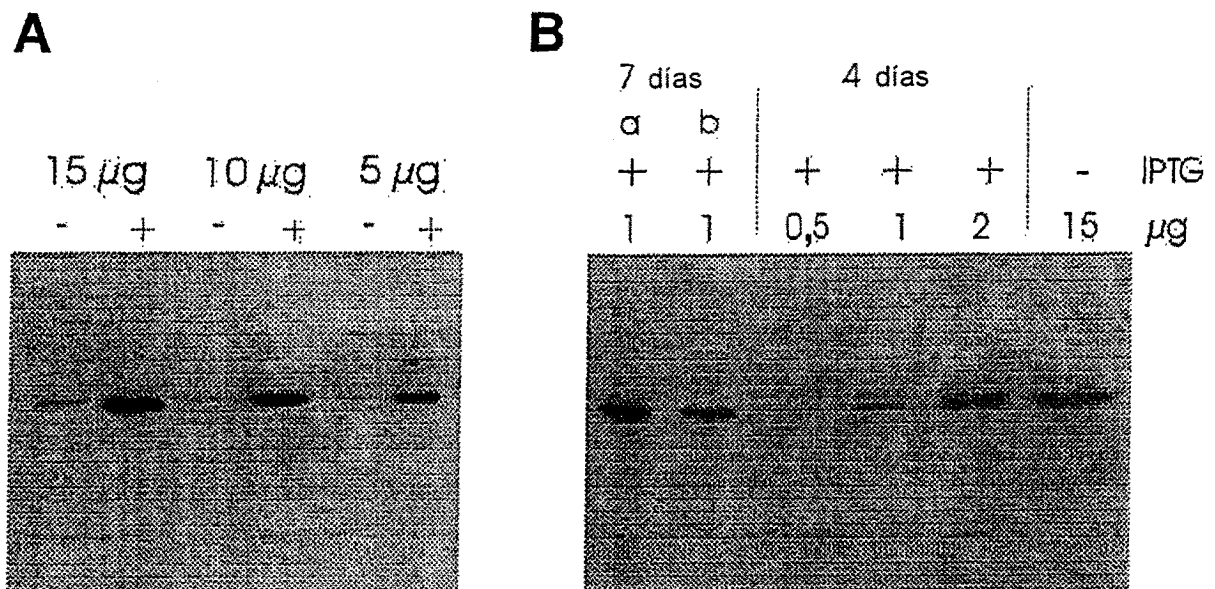


Fig. 2

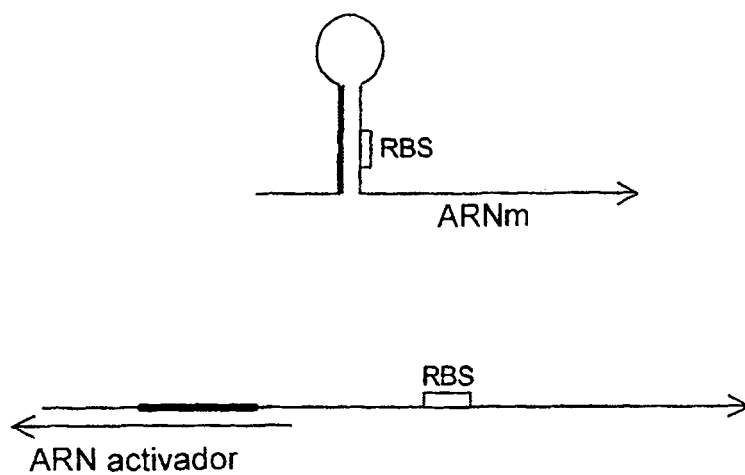


Fig. 3

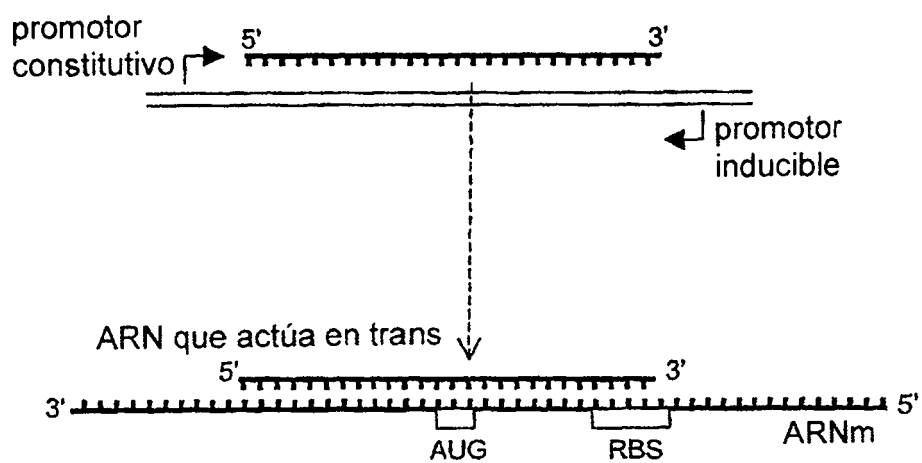


Fig. 4

ES 2 324 787 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Icon Genetics AG Muehlbauer, Stefan	
	<120> Control de la Expresión Génica en Plastos	
	<130> PCT-13034	
10	<140> PCT/EP2004/013780	
	<141> 03-12-2004	
15	<150> PCT/EP03/13 656	
	<151> 03-12-2003	
	<160> 21	
20	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
25	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 1	
35	gaccatggaa ccagtaacgt tatac gatg	29
	<210> 2	
40	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 2	
50	caactgcagtc actgcccgt ttccag	26
	<210> 3	
	<211> 40	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador de PCR	
	<400> 3	
65	acgatttgtga gcggataaca atatatttct gggagcgaac	40
	<210> 4	

ES 2 324 787 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
10	<400> 4	
	caatcccaag agcctcttat c	21
	<210> 5	
15	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 5	
25	gaccatggct agattagata aaagtaaag	29
	<210> 6	
	<211> 32	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador de PCR	
	<400> 6	
40	cactgcagtt aagaccact ttcacattta ag	32
	<210> 7	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 7	
	acgtccctat cagtgataga gtatatattct gggagcgaac	40
55	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
65	<400> 8	
	caatcccaag agcctcttat c	21

ES 2 324 787 T3

	<210> 9		
	<211> 36		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> ribointerruptor		
10	<400> 9		
	agatgatacc agccgaaagg cccttggcag ctctcg	36	
15	<210> 10		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
25	<400> 10		
	tttggatccg aattctacca ttcaacctctt ggatttgggt attaaagagg agaaggtata	60	
	tgagtaaagg agaagaac	78	
30	<210> 11		
	<211> 33		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
40	<400> 11		
	tatgagctct tatttgtata gtccatccat gcc	33	
45	<210> 12		
	<211> 89		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido de clonación		
55	<400> 12		
	tttcggccgc cgtcgttcaa tgagaatgga taagaggctc gtgggattga cgattgtgag	60	
	cggataacaa tatatttctg ggagcgaac	89	
60	<210> 13		
	<211> 110		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		

ES 2 324 787 T3

<223> Oligonucleótido de clonación

<400> 13

5 tttcggccgt ctagagatat atggtagtag taagttaatt ttcattaacc accactacca 60
 atcacctect ggaatttgggt cggccggagt tcgtctccag aaatatattg 110

<210> 14

<211> 113

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Oligonucleótido de clonación

<400> 14

tttcggccgt cgttcaatga gaatggataa gaggtcgtg ggattgacgt gagggggcag 60
ggatggctat atttctggga gcgaacggaa atgctagcca tatgtatc tcc 113

<210> 15

<211> 116

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Oligonucleótido de clonación

<400> 15

40 tttcggccgc cgtcgttcaa tgagaatgga taagaggctc gtgggattga cgattgtgag 60
cggataacaa tatatttctg ggagcgaacg gagatataca tatggctagc atttcc 116

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de translocación de membrana

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

55

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de translocación de membrana

ES 2 324 787 T3

<400> 17

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de translocación de membrana

<400> 18

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de translocación de membrana

<400> 19

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de translocación de membrana

<400> 20

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de translocación de membrana

ES 2 324 787 T3

<400> 21

	Lys	Glu	Thr	Trp	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Thr	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys
5	1				5					10					15	
	Lys	Lys	Arg	Lys	Val											
10				20												
15																
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																