



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 278**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01) **C12N 9/12** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01) **C12N 15/82** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01) **A01H 5/00** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955488 .0**

96 Fecha de presentación : **29.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1301532**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

54

Título: **Inhibidores de quinasa dependientes de ciclina de planta.**

30

Prioridad: **14.07.2000 US 218471 P**  
**13.10.2000 US 241219 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.06.2011**

73

Titular/es: **CROPDESIGN N.V.**  
**Technologiepark 3**  
**9052 Zwijnaarde-Gent, BE**

72

Inventor/es: **Frankard, Valérie, Marie-Noëlle, S.;**  
**Peres Bota, Adrian, Marius;**  
**Droual, Anne-Marie;**  
**Mironov, Vladimir;**  
**Inze, Dirk y**  
**Hatzfeld, Yves**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 360 278 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de quinasa dependientes de ciclina de planta

Solicitudes Relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional Estadounidense serie número 60/218,471, presentada en Julio 14, 2000 y de la solicitud de patente provisional Estadounidense serie número 60/241,219, presentada en Octubre 13, 2000.

Antecedente de la Invención

10 Cuando las células eucarióticas, por ejemplo, células de planta, se dividen ellas van a través de una secuencia altamente ordenada de eventos denominados colectivamente como el "ciclo celular." En resumen, la replicación o síntesis de ADN (S) y la segregación mitótica de los cromosomas (M) ocurre con fases de espacio que intervienen (G1 y G2) y las fases siguen la secuencia G1-S-G2-M. Se completa la división celular después de citoquinesis, la última etapa de la fase M. Las células que se han salido del ciclo celular y que están en reposo se dice que están en la fase G0. Las células en la etapa G0 se pueden estimular para reingresar al ciclo celular en la fase G1.

15 La transición entre las diferentes fases del ciclo celular se conduce básicamente por la activación/inactivación secuencial de una quinasa, conocido como "quinasa dependiente de ciclina" o "CDK" mediante diferentes moléculas. Se requieren para la activación de la quinasas las proteínas denominadas ciclinas que también son importantes para objetivar la actividad quinasa a un sustrato dado (subconjunto de). Otros factores que regulan la actividad CDK incluyen inhibidores CDK (conocido como CKIs, ICKs, Kips, Cips, Inks, o KRPs, es decir, proteínas relacionadas con Kip), quinasa activante CDK (CAK), fosfatasa CDK (Cdc25), y subunidad CDK (CKS) (Mironov et al. (1999) Plant Cell 11, 509-522 y Reed (1996). Prog. Cell Cycle Res. 2, 15-27).

25 La existencia de un inhibidor de CDK mitótico se infiere de los experimentos con endosperma de semilla de maíz (Grafi and Larkins (1995) Science 269, 1262-1264) pero solo recientemente se identifican ICK en plantas. Se han descrito hasta la fecha un total de siete cADN de Arabidopsis, un *Chenopodium rubrum*, y uno de alfalfa ICK. Las proteínas codificadas se caracterizan por un alargamiento de aproximadamente 35 aminoácidos de terminal carboxi que muestra homología para el dominio de unión de ciclina/Cdk de Terminal amino de ICK de animal de los tipos p21<sup>Cip1</sup>/p27<sup>Kip1</sup>/p57<sup>Kip2</sup>. Fuera de la región de terminal carboxi, los ICK de planta no se relacionan uno con el otro y no se han detectado homologías con otras secuencias de proteína.

30 La Arabidopsis ICK 1 es capaz de inhibir la actividad quinasa de Cdc2 de planta, pero no la actividad quinasa del Cdc2 humano o de *S. cerevisiae* Cdc28. El Arabidopsis ICK3 también inhibe la actividad quinasa Cdc2 de planta. El ICK1 y el ICK3 interactúan con Arabidopsis Cdc2a (Cdk tipo A) y ciclina D3, pero no con Arabidopsis Cdc2b (Cdk tipo B). El ICK1 también interactúa con ciclina D1 y ciclina D2, pero no con ciclina A2, ciclina B1, ciclina B2, o PCNA. Como se determina por ensayos de dos híbridos de levadura, la interacción entre ICK1 y ciclina D3 es mucho más fuerte que entre ICK1 y Cdc2a. La región de terminal carboxi de ICK1 (homólogo a los ICK de animal Cip1/Kip1,2) se requiere para asociación con Cdc2a y ciclina D3. La unión de estos socios, sin embargo, se mejora fuertemente con un mutante de eliminación de terminal amino que comprende el alargamiento en la dirección 5' de aproximadamente 50 aminoácidos del dominio de unión de ciclina/Cdk ICK1 en conjunto con este dominio. El ICK1 tipo natural no se fija tan fuerte como Cdc2a o ciclina D3 como el mutante de eliminación anterior, que sugiere la presencia de elementos desestabilizantes en la región de terminal amino de ICK1.

40 La expresión de ICK1 es alta en las hojas y el ácido abscísico y la incubación en condiciones a baja temperatura, que inhiben la división celular de la planta, induce la acumulación de transcritos ICK1 en semillas de Arabidopsis. La expresión del ICK2 es más prominente en los tallos en los ápices de florecencia, es más bajo en semillas de 1 mes de edad y el tratamiento sobrerregulado con 0.1% de NaCl (WO 9914331, Lui et al. (2000) Plant J. 21, 379-385, Wang et al. (1997) Nature 386, 451-452, WO 9964599).

45 Se han generado plantas de Arabidopsis, *Brassica napus* y *B. carinata* transgénicas que expresan ICK1 bajo el control del promotor AP2 que sostiene la expresión preferida del polen o bajo el control del promotor Bgl1 específico a antera. Los niveles de mRNA ICK1 incrementados en plantas Arabidopsis transgénicas (T1 y T2) se correlacionan con los efectos fenotípicos que varían de pétalos no visibles a pétalos visibles de tamaño reducido a pétalos normales. Solo las plantas con pétalos normales son auto fértiles. La semilla que se ajusta en las plantas transgénicas macho con los otros fenotipos se puede restaurar mediante fertilización con polen tipo natural. No se observa esterilidad macho significativa en plantas de Arabidopsis Bgl1-ICK1 transgénicas. Los efectos de AP2-ICK1 y Bgl1-ICK1 son menos severos y más pronunciados, respectivamente, en plantas *Brassica* transgénicas (W09964599).

5 Se han descrito muchas funciones diferentes para los ICADE de origen animal y estas incluyen: inhibición diferencial de la actividad de quinasa ciclina-Cdk, la regulación del ensamble del complejo ciclina-Cdk, la regulación concomitante de las células para dividir las señales mitogénicas y antimitogénicas integrantes, la regulación de la progresión del ciclo celular, regulación de replicación de ADN y reparación de ADN, regulación de transcripción de gen, regulación de degradación de ciclina, involucramiento en el retiro del ciclo celular y diferenciación celular, regulación de apoptosis, control de órgano y tamaño del organismo y regulación de endoreduplicación (Nakayama and Nakayama 1998 Bioessays 20, 1020-1029). Muchas de estas funciones se han atribuido a los dominios ICK fuera de las regiones de unión ciclina/Cdk.

10 En vista de la heterogeneidad de la secuencia inusualmente pronunciada entre los ICK de una única especie de planta y las diferencias en los patrones de expresión, se puede esperar que cada uno de los ICK de la planta sirva como única función para controlar el desarrollo de la planta. Tales funciones ICK de planta pueden incluir interferencia con eventos de ciclo celular similares a aquellos regulados por los ICK en animales pero aún no identificado en las plantas.

#### Resumen de la Invención

15 La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de moléculas novedosas, denominadas aquí como "Inhibidores de Quinasas Dependientes de Ciclina" o ácido nucleico "ICK" y moléculas de polipéptido. El ácido nucleico ICK y las moléculas de polipéptido de la presente invención son útiles como agentes de modulación en la regulación de la progresión del ciclo celular en, por ejemplo, plantas. El ácido nucleico ICK y las moléculas de polipéptido de la presente invención son particularmente útiles en agricultura y células de planta y cultivos de tejido.

20 En particular, la presente invención proporciona, con respecto a los estados designados CH, DE, FR, GB y LI, la materia objeto como se define en uno cualquiera o todos de (1A) a (16A) adelante:

(1A) Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44.

25 (2A) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43:

(3A) Un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 44.

(4A) Una planta transgénica que comprende un casete de expresión recombinante que incluye un promotor de planta ligado operablemente a la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43.

(5A) La planta transgénica como se establece en (4A) anterior, en donde la planta es una planta monocotiledónea.

30 (6A) La planta transgénica como se establece en (4A) anterior, en donde la planta es una planta dicotiledónea.

(7A) La planta transgénica como se establece en (4A) anterior, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de Arabidopsis thaliana, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.

35 (8A) Un método para incrementar los números de semillas o vainas de semilla en una planta que comprende regulación descendente de la expresión de un inhibidor de proteína quinasa dependiente de ciclina (ICK) en la endosperma de la planta, en donde dicha proteína ICK es:

(a) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o

(b) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o

40 (c) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o

(d) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o

(e) una proteína ICK funcionalmente activa de acuerdo con cualquiera de (c) o (d) que comprende dos o más y preferiblemente todos los seis de:

- (i) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido FIDKYNFD;
  - (ii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLPGRWFEW;
  - 5 (iii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido ELEAFFAAEE;
  - (iv) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido YLELRSRR; y
  - (v) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido MGKYMRKAK; y
  - (vi) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLGVRTRA.
  - 10 (9A) El método como se establece en (8A) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una molécula de ácido nucleico anticodificante.
  - (10A) El método como se establece en (9A) anterior, en donde dicha molécula de ácido nucleico anticodificante es oligonucleótido anticodificante.
  - 15 (11A) El método como se establece en (8A) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una ribozima.
  - (12A) El método como se establece en (8A) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de cosupresión.
  - (13A) El método como se establece en cualquiera de (8A) a (12A) anterior, en donde la dicha planta es una planta monocotiledónea.
  - 20 (14A) El método como se establece en cualquiera de (8A) a (12A) anterior, en donde la dicha planta es una planta dicotiledónea.
  - (15A) El método como se establece en cualquiera de (8A) a (12A) anterior, en donde la dicha planta se selecciona del grupo que consiste de Arabidopsis thaliana, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.
  - 25 (16A) El método como se establece en cualquiera de (8A) a (12A) anterior, en donde la dicha planta es arroz.
- En particular, la presente invención proporciona, con respecto de los estados designados AT, BE, DK, ES, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, FI, CY, TR, AL, LT, LV, MK y RO, la materia objeto se define en uno cualquiera o todos los (1B) a (22B) adelante:
- 30 (1B) Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13 o 44.
  - (2B) Un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13.
  - (3B) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43.
  - (4B) Un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 44.
  - 35 (5B) Un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 13.
  - (6B) Una planta transgénica que comprende un casete de expresión recombinante que incluye un promotor de planta ligado operablemente a la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43.
  - (7B) La planta transgénica como se establece en (6B) anterior, en donde la planta es una planta monocotiledónea.
  - 40 (8B) La planta transgénica como se establece en (6B) anterior, en donde la planta es una planta dicotiledónea.

- (9B) La planta transgénica como se establece en (6B) anterior, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.
- 5 (10B) Un método para incrementar los números de semillas o vainas de semilla en una planta que comprende regulación descendente de la expresión de un inhibidor de proteína quinasa dependiente de ciclina (ICK) en la endosperma de la planta, en donde dicha proteína ICK es:
- (a) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o
- (b) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o
- 10 (c) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o
- (d) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o
- (e) una proteína ICK funcionalmente activa de acuerdo con cualquiera de (c) o (d) que comprende adicionalmente dos o más y preferiblemente todos los seis de:
- 15 (i) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido FIDKYNFD;
- (ii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLPGRWFEW;
- (iii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido ELEAFFAAEE;
- 20 (iv) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido YLELRSRR; y
- (v) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido MGKYMRKAK; y
- (vi) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLGVRTRA.
- 25 (11B) El método como se establece en (10B) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una molécula de ácido nucleico anticodificante.
- (12B) El método como se establece en (11B) anterior, en donde dicha molécula de ácido nucleico anticodificante es oligonucleótido anticodificante.
- (13B) El método como se establece en (10B) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una ribozima.
- 30 (14B) El método como se establece en (10B) anterior, en donde la dicha regulación descendente es por medio de cosupresión.
- (15B) El método como se establece en cualquiera de (10B) a (14B) anterior, en donde la dicha planta es una planta monocotiledónea.
- 35 (16B) El método como se establece en cualquiera de (10B) a (14B) anterior, en donde la dicha planta es una planta dicotiledónea.
- (17B) El método como se establece en (10B) a (14B) anterior, en donde la dicha planta se selecciona del grupo que consiste de *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.
- (18B) El método como se establece en cualquiera de (10B) a (14B) anterior, en donde la dicha planta es arroz.
- 40 (19B) Un método para identificar un compuesto que se une a un polipéptido como se define en (2B) o (4B) anterior que comprende:

- a) poner en contacto el polipéptido, o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto de prueba; y
- b) determinar si el polipéptido se une al compuesto de prueba.

(20B) El método como se establece en (19B) anterior, en donde la unión del compuesto de prueba al polipéptido se detecta mediante un método que se selecciona del grupo que consiste de:

- 5 a) detección de la unión mediante detección directa de la unión del compuesto de prueba/polipéptido;
- b) detección de la unión utilizando un ensayo de unión de competición; y
- c) detección de la unión utilizando un ensayo para la actividad de ICK.

(21B) Un método para identificar un compuesto que modula la actividad un polipéptido como se define en (2B) o (4B) anterior que comprende:

- 10 a) poner en contacto un polipéptido de la Reivindicación 2 o 4 con un compuesto de prueba; y
- b) determinar el efecto del compuesto de prueba en la actividad el polipéptido para identificar por lo tanto un compuesto que modula la actividad el polipéptido.

(22B) Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK monocotiledóneo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13, y que comprende uno o más y preferiblemente todos los tres de:

- 15 (i) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido FIDKYNFD;
- (ii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLPGRWFEW;
- 20 (iii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido ELEAFFAAEE.

La materia objeto como se proporciona por la invención para los estados designados respectivos pertenece específicamente a la discusión y la descripción de la presente especificación.

25 La presente especificación también describe un método para modular el ciclo celular en una planta, por ejemplo, *arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, maíz, tomate, alfalfa, colza, soya, girasol, o canola, al introducir dentro de la planta un modulador ICK, de tal manera que se modula el ciclo celular en la planta. La planta puede ser una planta monocotiledónea o planta dicotiledónea.

En un ejemplo el modulador ICK es una molécula pequeña. En un ejemplo, el modulador ICK es capaz de modular la actividad del polipéptido ICK. Por ejemplo, el modulador ICK puede ser un anticuerpo anti-ICK o un polipéptido ICK que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 13, o 44, o un fragmento del mismo.

30 En otro ejemplo, el modulador ICK es capaz de modular la expresión del ácido nucleico ICK. Por ejemplo, el modulador ICK puede ser una molécula de ácido nucleico ICK anticodificante, una molécula de inactivación de gen ICK, una ribozima, o una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:4, 43, o 45, o un fragmento del mismo.

35 La presente especificación también describe un método para modular el crecimiento de la planta y/o el destino de la célula de la planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica de la planta y/o fisiología de la planta al introducir dentro de una planta un modulador ICK, de tal manera que se modula dicho crecimiento de la planta y/o el destino de la célula de la planta y/o morfología y/o bioquímica de la planta y/o fisiología de la planta.

40 La presente especificación también describe un método para mejorar la tolerancia a una condición de tensión ambiental, por ejemplo, sequía, salinidad, temperatura, o carencia de nutrientes, en una planta al introducir dentro de la planta un modulador ICK, de tal manera que se mejora la tolerancia a una condición de tensión ambiental en la planta.

La presente especificación también describe un método para mejorar la tolerancia a un patógeno de planta, por ejemplo, una bacteria patogénica tal como *Agrobacterium tumefaciens*, hongo patogénico de planta que incluye

Plasmodiophora brassicae, Crinipellis perniciosa, Pucciniastrum geoppertianum, Taphrina wiesneri, Ustilaga maydis, Exobasidium vaccinii, E. camelliae, Entorrhiza casparyana y Apiosporina morbosum, que maltrata el ciclo celular en una planta al introducir dentro de la planta un modulador ICK, de tal manera que se mejora la tolerancia a un patógeno de planta que maltrata el ciclo celular en la planta.

- 5 La presente especificación también describe un método para modular la actividad de ICK en una planta al introducir dentro de la planta un modulador ICK, de tal manera que se modula la actividad de ICK en la planta.

La presente especificación también describe un método para modular el ciclo celular en una célula de planta al poner en contacto la célula de planta con un modulador ICK, de tal manera que se modula el ciclo celular en la célula de planta.

- 10 La presente especificación también describe un método para modular el crecimiento de célula de planta y/o el destino de la célula de la planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica de la planta y/o fisiología de la planta al poner en contacto una célula de planta con un modulador ICK, de tal manera que se modula el crecimiento de célula de planta y/o el destino de la célula de la planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica de la planta y/o fisiología de la planta.

- 15 También se describen aquí los métodos para mejorar la tolerancia a una condición de tensión ambiental en una célula de planta y métodos para mejorar la tolerancia a un patógeno de planta que maltrata el ciclo celular en una célula de planta. Estos métodos incluyen poner en contacto la célula de planta con un modulador ICK, de tal manera que se mejora la tolerancia a una condición de tensión ambiental o a un patógeno de planta que maltrata el ciclo celular en la célula de planta.

- 20 También se describen aquí métodos para modular la actividad de ICK en una célula de planta. Los métodos incluyen poner en contacto la célula de planta con un modulador ICK, de tal manera que se modula la actividad de ICK en la célula de planta.

- 25 La presente especificación también describe plantas transgénicas (por ejemplo, plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas) que contienen una molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí. Por ejemplo, plantas transgénicas que contienen un casete de expresión recombinante que incluye un promotor de planta ligado operablemente a una molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO:43 o SEQ ID NO:45,).

- 30 La presente especificación también describe semilla, polen, recortes, y flores de las plantas transgénicas. La presente especificación también describe métodos para modular, en una planta transgénica, la expresión de los ácidos nucleicos de la invención.

También se describen aquí las moléculas de ácido nucleico aislado que incluyen la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45, o complementos de los mismos.

- 35 En un aspecto, la invención caracteriza una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO:13, o 44, o un complemento de la molécula de ácido nucleico aislada.

En otro aspecto, la presente invención caracteriza un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:13, o 44, o fragmentos de los mismos.

- 40 Las proteínas de la presente invención o sus porciones, por ejemplo, sus porciones biológicamente activas, se pueden ligar operablemente a un polipéptido no ICK (por ejemplo, secuencias de aminoácido heterólogas) para formar proteínas de fusión. La invención caracteriza adicionalmente anticuerpos, tal como anticuerpos monoclonales o policlonales, que se unen específicamente a los polipéptidos ICK de la invención. Adicionalmente, los polipéptidos ICK o sus porciones biológicamente activas se pueden incorporar dentro de las composiciones farmacéuticas, que incluyen opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables.

- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto que se une a un polipéptido ICK de la presente invención. El método incluye poner en contacto el polipéptido, o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto de prueba; y determinar si el polipéptido se une al compuesto de prueba. En una realización, la unión del compuesto de prueba al polipéptido se detecta mediante detección directa de la unión del compuesto de prueba/polipéptido. En otra realización, la unión del compuesto de prueba al polipéptido se detecta mediante detección de la unión utilizando un ensayo de unión de competición. En todavía otra realización, la unión del compuesto de prueba al polipéptido se detecta utilizando un ensayo para la actividad de ICK.
- 50

La presente especificación también describe un método para modular la actividad un polipéptido ICK de la presente invención. El método incluye poner en contacto el polipéptido o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto que se une al polipéptido en una concentración suficiente para modular la actividad del polipéptido.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad un polipéptido ICK de la presente invención. El método incluye poner en contacto un polipéptido ICK con un compuesto de prueba; y determinar el efecto del compuesto de prueba en la actividad el polipéptido para identificar por lo tanto un compuesto que modula la actividad el polipéptido.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

## 10 Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 describe la secuencia de nucleótido del cADN OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:9). Se indican en el marco de lectura abierta (entre paréntesis redondos) el codón de inicio y el codón de detención (subrayado). También se indican los sitios de poliadenilación (doble subrayado), los elementos ricos en AU o los ARE (cursiva), y la región extra 3'UTR de la SEQ ID NO:9 comparado con SEQ ID NO:1 (subrayado entre paréntesis cuadrados).

- 15 La Figura 2 describe la secuencia de nucleótido del cADN OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO:43). Se indican en el marco de lectura abierta (entre paréntesis redondos) el codón de inicio y el codón de detención (subrayado). También se indica el elemento rico en AU o ARE (cursiva).

- La Figura 3 describe una alineación de aminoácido de la secuencia de aminoácido OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:10), la secuencia de aminoácido OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO:43) y la secuencia de aminoácido OsICK5 de longitud completa predicha (SEQ ID NO:55) con la secuencia de aminoácidos de otros ICK de planta conocidos: los siete ICK de Arabidopsis (ICK1 a ICK7), el ICK Medicago sativa (alfalfa ICK), y el ICK del Chenopodium rubrum (Chenopod ICK). La alineación se hace utilizando ClustalW como parte del software VNTI (versión 5.5; InforMax Inc.) utilizando ajustes de parámetros determinados (matriz de clasificación blosum 62; penalidades de abertura de espacio para alineación múltiple y en forma de par = 10; penalidades de extensión de espacio para alineación en forma de par = 0.1; penalidades de extensión de espacio para alineación múltiple = 0.05). Los residuos de aminoácido idénticos se indican en las casillas sombreadas en negro. Los residuos de aminoácido conservados se indican en los cuadros sombreados en gris de acuerdo con los grupos (M,I,L,V), (A,G,S,T), (R,K,H), (F,W,Y), (D,E) y (N, Q).
- 20
- 25

- La Figura 4 describe una alineación de aminoácido de las partes relevantes de la secuencia de aminoácido OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:10), la secuencia de aminoácido OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO:43) y la secuencia de aminoácido OsICK5 de longitud completa predicha (SEQ ID NO: 55) con la secuencia de aminoácido parcial de OsICK1 (SEQ ID NO:11), la secuencia de aminoácido parcial de OsICK3 (SEQ ID NO:12), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK1 (SEQ ID NO: 14), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK2 (SEQ ID NO:15), la secuencia de aminoácido parcial del Sorgo bicolor ICK (SEQ ID NO:16), y la secuencia de aminoácido parcial del Pinus taeda ICK (SEQ ID NO:17). La alineación se hace utilizando ClustalW como parte del software VNTI (versión 5.5; InforMax Inc.) utilizando ajustes de parámetros determinados (matriz de clasificación blosum 62; penalidades de abertura de espacio para alineación múltiple y en forma de par = 10; penalidades de extensión de espacio para alineación en forma de par =0.1; penalidades de extensión de espacio para alineación múltiple = 0.05). Los residuos de aminoácido idénticos se indican en las casillas sombreadas en negro. Los residuos de aminoácido conservados se indican en las casillas sombreadas en gris de acuerdo con los grupos (M,I,L,V), (A,G,S,T), (R,K,H), (F,W,Y), (D,E) y (N, Q).
- 30
- 35
- 40

- La Figura 5 es una representación esquemática de los motivos conservados en las moléculas ICK de planta (utilizando la misma numeración indicada en la Tabla 1). Se indican adicionalmente en la Figura 4 los elementos de estructura secundaria que se predicen están presentes en las moléculas de ICK de planta. (H: estructura helicoidal  $\alpha$  predicha en un alargamiento de por lo menos 4 residuos de aminoácido consecutivos. E: la estructura de lámina  $\beta$  extendida predicha en un alargamiento de por lo menos 4 aminoácidos consecutivos).
- 45

- La Figura 6 describe las regiones de secuencia Cy presentes en diferentes proteínas de mamífero y la secuencia consensus derivada. El p21Cip1, p27Kip1 y p57kip2 son tres tipos de inhibidores quinasa dependientes de ciclina de mamífero. El Cdc25A es una fosfatasa de proteína específica G1/S que tiene proteínas relacionadas con Cdc2 como sustratos. El p 107 pertenece a la familia de las proteínas de bolsillo también que incluye p130 y pRB. El E2F1 es un activador transcripcional involucrado en la activación de la expresión de gen específica de fase S. El X puede ser cualquier aminoácido y H puede ser M, I, L o V.
- 50

La Figura 7 es una mancha que describe la expresión de OsICK1 ('ICK1'), OsICK2 ('ICK2') y OsICK4 ('ICK4') en diferentes tejidos de plantas de arroz. El cADN obtenido por RT-PCR se somete a análisis de transferencia de gel de



ADN con sondas marcadas con biotina específicas para OsICK1, OsICK2 y OsICK4. (R: tejido de raíz, L: tejido de hoja, STM: tejido de meristema de tallo, ST: tejido de tallo, S: semillas).

5 La Figura 8 es una mancha que describe la expresión de OsICK1 ('ICK1'), OsICK2 ('ICK2') y OsICK4 ('ICK4') en desarrollar granos de arroz. El cADN obtenido por RT-PCR se somete a análisis de transferencia de gel de ADN con sondas marcadas con biotina específicas para OsICK1, OsICK2 y OsICK4. (DAP: días después de polinización).

10 La Figura 9 describe los resultados de un análisis de hibridación in situ de la expresión OsICK2 en semillas de arroz recolectadas 7 días después de polinización. La microscopía de campo oscuro (panel derecho) visualiza una señal de hibridación clara (blanco brillante) en las capas de la célula que circundan la endosperma desarrollada (flecha blanca). También es evidente la señal de hibridación desigual en el embrión desarrollado (flecha blanca). La imagen microscópica de campo brillante (panel izquierdo) muestra la morfología de la sección teñida de azul toluidina.

15 La Figura 10A-I describe los resultados de un análisis de hibridación in situ de la expresión OsICK2 en semillas de arroz recolectadas 20 días después de polinización. (A) y (B) son imágenes microscópicas de campo brillante y de campo oscuro, respectivamente, de la misma sección longitudinal. (C) es una magnificación de una parte de (A). Claramente visible es la señal de hibridación (blanco brillante) en el escutelo (flecha blanca). (D) y (E) son imágenes microscópicas de campo brillante y de campo oscuro, respectivamente, de la misma sección cruzada. (F) es una magnificación de una parte de (D). Las señales de hibridación en (D) y (F) muestran la expresión de OsICK2 en la capa o capas de la célula revestida en la endosperma desarrollada (flechas blancas). (G) y (H) son imágenes microscópicas de campo brillante y de campo oscuro, respectivamente, de la misma sección longitudinal que de nuevo muestran la expresión OsICK2 en las capas celulares circundantes de la endosperma desarrollada (flecha blanca). Lo mismo se muestra en la imagen microscópica de campo brillante (I) en donde la señal de hibridación es negra (flecha negra).

25 La Figura 11 describe A la comparación de las secuencias de cADN OsICK4 (Panel A) y las secuencias de proteína OsICK4 (Panel B) obtenidas por (i) detección de interacción de dos híbridos de levadura de colección de cADN de dos híbridos de arroz utilizando Cdc2-Os1 como cebo y mediante (ii) detección de hibridación de la misma colección. La secuencia de ADN OsICK4 de longitud completa obtenida mediante detección de hibridación se da en el Panel A con el ORF entre los paréntesis. Adicionalmente se indica en el Panel A la parte de la pérdida de cADN OsICK4 en el clon identificado por la clonación de interacción de dos híbridos de levadura, dicha parte se indica en cursivas subrayadas. La secuencia de aminoácido OsICK4 de longitud completa se da en el Panel B en donde este se identifica como "HYB ICK4". Adicionalmente se indica en el Panel B la parte de la secuencia de aminoácido codificada por el clon OsICK4 parcial como se destaca en el Panel A. La secuencia de aminoácido parcial se identifica en el Panel B como "2-H ICK4". Los aminoácidos comunes de ambas proteínas se somborean en gris.

35 La Figura 12 muestra la secuencia de proteína OsICK4 fuertemente predicha presente en GenBank (número de acceso GenBank AC069145 versión 5 de Septiembre 30, 2000; proteína ID = AAG16867.1). Los 48 aminoácidos superfluos en la proteína predicha, la secuencia que no está presente en la secuencia de proteína derivada (SEQ ID NO:44) del cADN OsICK4 obtenido experimentalmente (SEQ ID NO:43) se indican entre paréntesis cuadrados y como caracteres en negrilla subrayados.

La Figura 13 describe el vector de transformación de planta binario p0428 ICK4 que comprende el ORF OsICK4 ligado operablemente al promotor GOS2.

40 La Figura 14 describe el vector pUC18-ICK4 CS derivado pUC18 que comprende el casete con repeticiones invertidas de un fragmento de cADN OsICK4 separadas por la secuencia MAR de tabaco. Este casete se utiliza para la cosupresión de expresión OsICK4 en plantas transgénicas.

La Figura 15 describe el vector de transformación de planta binario p0490 que comprende el casete de cosupresión OsICK4 de pUC-ICK4 CS (ver Figura 13) ligado operablemente al promotor GOS2.

45 La Figura 16 describe el vector de transformación de planta binario p0489 que comprende el casete de cosupresión OsICK4 de pUC-ICK4 CS (ver Figura 13) ligado operablemente al promotor prolamina.

La Figura 17 describe el vector de transformación de planta binario p0488 que comprende el casete de cosupresión OsICK4 de pUC-ICK4 CS (ver Figura 13) ligado operablemente al promotor oleosina.

La Figura 18 describe el vector de transformación de planta binario p0559 que comprende el casete de cosupresión OsICK4 de pUC-ICK4 CS (ver Figura 13) ligado operablemente al promotor glutelina.

La Figura 19 describe el fragmento genómico que corresponde al cADN OsICK4 de longitud completa.

La Figura 20 describe el fragmento genómico que corresponde al cADN OsICK5 de longitud completa. El fragmento descrito (SEQ ID NO:56) corresponde al complemento inverso de los nucleótidos 6331 a 7403 del número de acceso GenBank AP003525.1 disponible en Junio 26, 2001. Se indican en los cuadros sombreados en gris las posiciones de los cebadores (SEQ ID NO:57 y 58) utilizados para amplificar el fragmento genómico OsICK5.

La Figura 21 describe la secuencia de cADN OsICK5 de longitud completa predicha (SEQ ID NO:54; panel A) y la secuencia de proteína OsICK5 de longitud completa deducida de la misma (SEQ ID NO:55; panel B). Los residuos inciertos en el cADN predicho se indican mediante 'N' y se marcan mediante un cuadro sombreado en gris. La traducción de residuos inciertos de nucleótido en el cADN resulta en un residuo incierto de aminoácido 'X' en la secuencia de proteína deducida también marcada por un cuadro sombreado en gris. Adicionalmente se indican en el panel (A) en los cuadros sombreados en gris las posiciones de los cebadores (SEQ ID NO: 57 y 58) utilizados para amplificar el cADN OsICK5. Se indican en las casillas sombreadas en negro el codón de inicio y el codón de detención.

#### Descripción Detallada de La invención

La presente especificación describe el descubrimiento de moléculas novedosas, denominadas aquí como "Inhibidores de Quinasas Dependientes de Ciclina " o ácido nucleico "ICK" y las moléculas de polipéptido. En particular, el descubrimiento de las primeras monocotiledóneas (monocotiledónea), por ejemplo, cereal, molécula de ICK. Las moléculas de ICK que se describen aquí se identifican mediante la prospección de base de datos utilizando el motivo de aminoácido "GRYEW" como una secuencia de consulta. Este motivo está presente en el terminal carboxilo en todas las moléculas ICK de planta conocidas.

Como se utiliza aquí, los términos "Inhibidores de Quinasas Dependientes de Ciclina" e "ICK" incluyen las moléculas descritas aquí que son capaces de inhibir la actividad una Quinas Dependiente de Ciclina (CDK), por ejemplo, un CDK de planta. Los CDK son un grupo de quinasas serina/treonina que regulan la progresión del ciclo celular en los eucariotes, por ejemplo, plantas. Los CDK se complejan típicamente con ciclinas que forman un complejo de enzima, el CDK es la subunidad catalítica y la ciclina es la subunidad reguladora del complejo de enzima (Wang, H. (1997) Plant Journal 15(4):501-510). Las moléculas ICK de la presente invención, por ejemplo, las moléculas ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, tienen típicamente una o más de las siguientes actividades: inhibición de la actividad CDK (por ejemplo, actividad ciclina-CDK); regulación del ensamble de complejo ciclina-CDK; regulación concomitante para dividir las células, por ejemplo, al integrar las señales mitogénicas y antimitogénicas; regulación de la progresión del ciclo celular; regulación de la replicación de ADN y/o reparación del ADN; ellos regulan la transcripción de gen; regulación de la degradación de ciclina; involucramiento en el retiro del ciclo celular y/o diferenciación celular; regulación de muerte celular, por ejemplo, apoptosis; control de órgano (por ejemplo, órgano de planta) y/o tamaño del organismo (por ejemplo, organismo de planta); y regulación de endoreduplicación.

Como se utiliza aquí, el término "ciclo celular" incluye los eventos estructurales y bioquímicos cíclicos con el crecimiento, división, y proliferación de células, y en particular con la regulación de la replicación de ADN y mitosis. El ciclo celular se divide en periodos llamados: Go, Gap, (G1), síntesis de ADN (S), Gap2 (G2), y mitosis (M). Normalmente estas cuatro fases ocurren secuencialmente, sin embargo, el término ciclo celular también incluye ciclos modificados en donde una o más fase están ausentes que resultan en un ciclo celular modificado tal como endomitosis, acitoquinesis, poliploidía, politenia, y endoreduplicación.

Como se utiliza aquí, el término "planta" incluye plantas completas, órganos de planta (por ejemplo, hojas, tallos, o raíces), tejido de planta, semillas de planta, y células de planta y su progenie. La clase de plantas que se puede utilizar en los métodos de la invención es generalmente tan amplio como la clase de plantas mayores favorables para técnicas de transformación, que incluye plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Particularmente se prefieren plantas *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, cebada, sorgo, maíz, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, algodón, girasol o canola. El término planta también incluye plantas monocotiledóneas (monocotiledónea) y plantas dicotiledóneas (dicotiledónea) que incluyen una legumbre de forraje o con forraje, plantas ornamentales, cultivos alimenticios, árboles, o arbustos seleccionados de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis austr-alis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp, *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chaenomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Diheteropogon amplexens*, *Dioclea* spp, *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrtaria* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp, *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp, *Gossypium hirsutum*,

5 Grevillea spp., Guibourtia coleosperma, Hedysarum spp., Hemarthia altissima, Heteropogon contortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris spp., Leptarrhenia pyrolifolia, Lespediza spp., Lettuce spp., Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesii, Lotus spp., Macrotyloma axillare, Malus spp., Manihot esculenta, Medicago sativa, Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, Nicotianum spp., Onobrychis spp., Ornithopus spp., Oryza spp., Peltophorum africanum, Pennisetum spp., Persea gratissima, Petunia spp., Phaseolus spp., Phoenix canariensis, Phormium cookianum, Photinia spp., Picea glauca, Pinus spp., Pisum sativum, Podocarpus totara, Pogonarthria fleckii, Pogonarthria squarrosa, Populus spp., Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus spp., Rhamphiolepis umbellata, Rhopalostylis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes spp., Robinia pseudoacacia, Rosa spp., Rubus spp., Salix spp., Schyzachyrium sanguineum, Sciadopitys verticillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorgho bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthes humilis, Tadehagi spp, Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium spp., Triticum spp., Tsuga heterophylla, Vaccinium spp., Vicia spp., Vitus vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aethiopica, Zea mays, amaranto, alcachofa, espárragos, brócoli, col de bruselas, repollo, canola, zanahoria, coliflor, apio, col, lino, col, lenteja, colza, oca, cebolla, papa, arroz, soya, paja, remolacha, caña de azúcar, girasol, tomate, calabaza, y té, entre otros, o las semillas de cualquier planta específicamente nombrada anteriormente o un tejido, célula o cultivo de órgano de cualquiera de las especies anteriores.

20 El término "célula de planta ", como se utiliza aquí incluye semillas, por ejemplo, cultivos de suspensión de semilla, embriones, células de regiones meristemáticas, células de tejido de callo, células de hojas, células de raíces, células de brotes, gametofitos, esporofitos, polen, y microesporas.

25 Las moléculas ICK que se describen aquí se involucran en la regulación del ciclo celular en plantas. De acuerdo con lo anterior, la molécula ICK que se describe aquí, o sus derivados, se puede utilizar para modular el ciclo celular en una planta al, por ejemplo, modular la actividad o el nivel de la expresión de ICK; alterar el índice del ciclo celular o fases del ciclo celular; o alterar la entrada dentro y fuera de las varias fases de ciclo celular. En plantas, las moléculas ICK que se describen aquí se pueden utilizar en la agricultura para, por ejemplo, mejorar las características de crecimiento de una planta tal como el índice de crecimiento de una planta; el tamaño de tejidos u órganos específicos en una planta; o la arquitectura o morfología de una planta. Las moléculas ICK que se describen aquí también se pueden utilizar en la agricultura para incrementar la producción de cultivo, mejorar la tolerancia a condiciones de tensión ambiental (tal como sequía, sal, temperatura, o carencia del nutriente), mejorar la tolerancia a un patógeno de planta que maltrata el ciclo celular, o como objetivos para facilitar la identificación de inhibidores o activadores de los ICK que pueden ser útiles como herbicidas o reguladores de crecimiento de la planta.

35 Como se utiliza aquí, el término "trastornos asociados con el ciclo celular" incluye un trastorno, enfermedad o afección que se origina o se caracteriza por una regulación deficiente (por ejemplo, regulación descendente o sobrerregulación), abuso, disminución, o modificación del ciclo celular. En las plantas los trastornos asociados con el ciclo celular incluyen endomitosis, acitoquinesis, poliploidía, politenia, y endoreduplicación que se puede originar por factores externos tal como patógenos (nematodos, virus, hongos, o insectos), químicos, tensión ambiental (por ejemplo, sequía, temperatura, nutrientes, o luz UV) que resulta en, por ejemplo, tejido neoplásico (por ejemplo, vesículas, agallas) o inhibición de división/proliferación celular (por ejemplo, retraso en el crecimiento).

40 La presente especificación describe el descubrimiento de moléculas novedosas, denominadas aquí como proteína ICK y moléculas de ácido nucleico, que comprende una familia de moléculas que tienen ciertas características funcionales y estructurales conservadas. El término "familia" cuando se refiere a la proteína y moléculas de ácido nucleico descritas aquí está destinado a significar dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que tienen dominio o motivo estructural común y que tienen suficiente homología de la secuencia de nucleótido o aminoácido como se define aquí. Tales miembros de la familia pueden ser de ocurrencia natural o no natural y pueden ser de la misma o diferentes especies. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de planta, por ejemplo, origen de arroz, así como también otras, proteínas de planta distintas, por ejemplo, origen de arroz, o alternativamente, puede contener homólogos de otra planta, por ejemplo trigo o maíz, o de origen de no planta. Los miembros de una familia también pueden tener características funcionales comunes

50 La presente especificación describe que una proteína ICK como se describe aquí, por ejemplo, una proteína ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, se puede identificar con base en la presencia de por lo menos uno o más de los siguientes motivos:

Motivo 1: FXXKYNFD (SEQ ID NO:18), en donde X es cualquier aminoácido

Motivo 2: [P/L]LXGRYEW (SEQ ID NO:19), en donde X es cualquier aminoácido y [P/L] significa que una prolina o una leucina aparece en la posición indicada

55 Motivo 3: EXE[D/E]FFXXXE (SEQ ID NO:20), en donde X es cualquier aminoácido y [D/E] significa que un aspartato o un glutamato aparece en la posición indicada

Motivo 4: YXQLRSRR (SEQ ID NO:21), en donde X es cualquier aminoácido

Motivo 5: MGKY[M/I][K/R]KX[K/R] (SEQ ID NO:22), en donde X es cualquier aminoácido, [M/I] significa que una metionina o una isoleucina aparece en la posición indicada, y [K/R] significa que una lisina o una arginina aparece en la posición indicada

5 Motivo 6: SXGVRTRA (SEQ ID NO:23), en donde X es cualquier aminoácido

(Los anteriores motivos se resumen en la Tabla 1 y se representan gráficamente en la Figura 4).

10 La presente especificación describe que una molécula ICK como se describe aquí, por ejemplo, una molécula ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz may, contienen dos, tres, cuatro, cinco, o, más preferiblemente, todos los seis motivos anteriores. Todos los seis motivos anteriores están presentes en proteínas OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:10), OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO:44) y OsICK5 de longitud completa (SEQ ID NO:55) como se describe aquí. Aunque los motivos 2 y 5 están presentes en la proteína OsICK5 de longitud completa predicha, ellos se desvían de las secuencias consensus.

15 Los motivos 1, 2, y 3 se encuentran típicamente en la región de terminal carboxilo de las proteínas ICK de planta. Esta región se considera que se involucra en la interacción de los ICK con los CDK y las ciclinas (Chen et al. (1996) Mol. Cell Biol 16, 4673-4682, Matsuoka et al. (1995) Genes Dev. 9, 650-662, y Nakayama and Nakayama (1998) Bioessays 20, 1020-1029). Los motivos 4, 5, y 6 se encuentran típicamente en la región de terminal amino de proteínas ICK de planta.

Tabla 1. Motivos conservados en proteínas ICK. ICK1 a ICK7 de planta que denotan los ICK de Arabidopsis thaliana.

	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4	Motivo 5	Motivo 6
Alfa ICK	198-FMEKYNFD	211-PLPGRYET	182-EFEFFCAKHE	74-iQLRNRR	1-MGKYMKKLK	45-SDGVRTRA
ICK1 AC003040	167-FKKKYNFD	180-PLGGRYEW	151-EIEDFFVEAE	20-YMQLRSRR		
ICK2 AL132979	183-CSMKYNFD	197-LGGGRYEW	164-ELEDFQVAE			
ICK3 AB012242	197-FMEKYNFD	210-PLSGRYEW	181-EMEEFFAYAE	58-iQLRSRR	1-MGKYMKKSK	26-SPGVRTRA
ICK4 AC003974	264-FIEKYNFD	277-PLPGRFEW	248-EMDEFFSGAE	102-iQLRSRR	1-MGKYIRKSK	44-SLGLVTRA
ICK5 AB028609	164-FIQKYNFD	177-PLPGRYEW	148-EIEDFFASAE	54-iQLRSRR	1-MGKYIKKSK	24-ALGFRTRA
ICK6 AP000419	173-FIEKYNFD	186-PLGGRYKW	155-EIEDLFSELE			
ICK7 AC011807	170-FTEKYNFD	183-PLGGRYQW	154-ELDDFFSAAE			
Chenopodi um ICK AJ002173	171-SEKYNFD	184-PLKGRYDW	155-EIEEFFFAVAE	25-IPQLRSRR		
OsICK2	233-FAAKYNFD	247-LDAGRFEW	217-EIEAFFAAAE	75-iQLRSRM	1-MGKYMRRKFR	24-WGVRTRS
OsICK1----YNYD		PLQGRYEW				
OsICK3	FAEKY ---		EIEAFFAAAE			
OsICK4	170-FIDKYNFD	183-PLPGRFEW	154-ELEAFFAAEE	48-iELRSRR	1-MGKYMRRKAK	28-PLGVRTRA
OsICK5	196-FAAKYNFD	209-PLDAGGAGRF EW	180-EIEEFFLAAAE	63-iRLRSRR	1-MGKKKKRDG	20-VGGVRTRA
ZmICK1	FASKYNFD	LDAGRFEW	EIQEFFAAAE			
ZmICK2	FIDKYNFD	PLPGRFEW	EMNEYFAAEQ			
SbICK	FAEAYNYD	PLEGRFEW	EIEAFFAAAE			
CONSENSUS	FX <sub>2</sub> KYNFD	[P/L]LXGR[Y/F]EW	EXE[D/E]FFX3E	YXQLRSRR	MGKY[M/I][K/R][KX][KR]	SXGVRTRA

5 Las proteínas ICK como se describe aquí de una planta monocotiledónea tal como arroz, en particular, se caracterizan por alargamientos  $\alpha$ -helicoidales extensivos especialmente entre los motivos 5 y 6 y entre los motivos 6 y 4. Adicionalmente, en las proteínas ICK como se describe aquí de una planta monocotiledónea tal como arroz, la región entre los motivos 4 y 3, solo contiene los segmentos  $\alpha$ -helicoidales predichos y no las láminas  $\beta$  extendidas. Estas características de estructura secundaria de las proteínas ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, son diferentes de aquellas encontradas en alfalfa ICK y ICK de Arabidopsis ICK3, ICK4 y ICK5.

10 La presente especificación también describe que una proteína ICK como se describe aquí presente por ejemplo, una proteína ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, se puede identificar con base en la presencia de una "secuencia Cy." Como se utiliza aquí, el término "secuencia Cy" incluye una secuencia de aminoácido de aproximadamente 5 residuos de aminoácido en longitud que tiene la secuencia consenso RXHuF (SEQ ID NO:24), en donde X es cualquier aminoácido y Hu es un aminoácido sin carga hidrófoba, tal como M, I, L o V (ver Figura 5). Las secuencias Cy se involucran típicamente en la interacción de los ICK con ciclinas. Los residuos de aminoácido 81-84 de la proteína OsICK2 (SEQ ID NO:10) se predice que comprenden una secuencia Cy (RMLF).

15 La presente especificación también describe que una proteína ICK como se describe aquí por ejemplo, una proteína ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, se puede identificar con base en la presencia de una "secuencia de localización nuclear." Como se utiliza aquí, el término "secuencia de localización nuclear" incluye una secuencia de aminoácido de aproximadamente 4-20 residuos de aminoácido en longitud, que sirve para dirigir una proteína en el núcleo. Típicamente, la secuencia de localización nuclear es rica en aminoácidos básicos, tal como arginina (R) y lisina (K). Una señal de localización nuclear puede tener una o más de las secuencias descritas en la Tabla 2. Las señales de localización nuclear se describen en, por ejemplo, Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7, los contenidos de cuales se incorporan aquí como referencia. Los residuos de aminoácido 54-57 de la proteína OsICK2 (SEQ ID NO:10) comprenden una secuencia de localización nuclear. La proteína OsICK4 (SEQ ID NO:44) comprende múltiples secuencias de localización nuclear como se indica en la Tabla 2. También la proteína OsICK5 de longitud completa predicha (SEQ ID NO:55) comprende una región de localización nuclear de terminal amino (ver Tabla 2). El PSORT utiliza las siguiente dos reglas para detectarla: 4 patrones de residuo compuestos de aminoácidos básicos (K o R), o compuestos de tres aminoácidos básicos (K o R) y H o P; un patrón que parte con P y luego dentro de 3 residuos mediante un segmento básico que contiene 3 K o R residuos de 4 residuos. Otro tipo de señal objetivo nuclear es el tipo de nucleoplasmina Xenopus propuesta por Robbins et al. (J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey, y C. Dingwall, Cell, 64, 615, 1991). El patrón es: 2 residuos básicos, 10 espaciadores de residuo, y otra región básica que consiste de por lo menos 3 residuos básicos de 5 residuos.

20

25

30

Tabla 2: Secuencias de localización nuclear potenciales (NLS) identificadas en los ICK de planta utilizando el PSORT/Predicción del software de localización de proteína software (<http://psort.nibb.ac.jp>).

	Tipo NLS	
ICK	4-patrones de residuo	Robbins & Dingwall consensus
Alfalfa ICK		80 <sup>a</sup> -RRLKRPLIRQHSAKRNK
Chenopodium ICK		15-KK/VS/SYNIPQLRSRR
ICK2	23-KRRK	
ICK4	123-KRRK 240-HRRR 241-RRRP	108-RRLQKKPPIVVIRSTKR 112-KKPPIVVIRSTKRRKQQ
ICK5		60-RRLVKLPLLTNTRKQQK
ICK7	5-KPKR 142-KKKK	
OsICK2 <sup>b</sup>	54-RRRK	
OsICK5	3-KKKK 4-KKKR	
<sup>a</sup> Posición del primer aminoácido del sitio en la secuencia de aminoácido del ICK indicado. <sup>b</sup> Identificación de los NLS OsICK2 se hace manualmente, es decir, la secuencia de proteína no se analiza utilizando el software PSORT público en el sitio Web indicado.		

5 La presente especificación también describe que una proteína ICK como se describe aquí, por ejemplo, una proteína ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, se puede identificar con base en la presencia de una "secuencia PEST." Como se utiliza aquí, el término "secuencia PEST" incluye una secuencia de aminoácido que se enriquece en los residuos de aminoácido prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T) y que está presente en proteínas con un alto índice de renovación proteolítica. Las secuencias PEST se describen en, por ejemplo, Rogers et al. (1986) Science 234, 364-368, los contenidos los cuales se incorporan aquí como referencia. Los residuos de aminoácido 167-191 de la proteína OsICK2, los residuos de aminoácido 117-131 de la proteína OsICK4 y los  
 10 residuos de aminoácido 128-145 de la proteína OsICK5 de longitud completa predicha comprenden secuencias PEST potenciales (ver Tabla 3).

Tabla 3: Secuencias PEST potenciales identificadas en los ICK de planta utilizando el software PESTFIND descargado de <http://www.ebi.ac.uk> y que corre en el servidor local.

ICK	Secuencias PEST potenciales	Clasificación PEST
Alfalfa ICK	11 <sup>a</sup> -KSESPSPNSTPTPSPSPSPPTPITNSPPPTTPNSSDGV R	+24.12
Chenopodium ICK	105-RTADPEVESGEASSK	+11.43
ICK2	71-RDSPPVEEQCQIEEEDSSVSCCSTSEEK	+15.46
ICK4	243-RPTTPEMDEFFSGAEEQQK	+9.21
ICK5	100-KLEPDTTTEEACGDNER	+13.68
ICK6	24-KLNDSSDSSPDSH	+12.76
	118-KETSPVSEGLGETTTEMESSATK	+15.73
	149-KTPTAAEIEDLFSELESQDDK	+8.59
OsICK2	167-RETPSSFLPGEVSDLESFLAGGQK	+4.75
OsICK4	117-RDPDTISTPGSTTR	+13.74
OsICK5	128- RPPGDADSSDAESNQEAK	+13.12
<sup>a</sup> Posición del primer aminoácido del sitio en la secuencia de aminoácido del ICK indicado.		

Las proteínas ICK aisladas como se describe aquí por ejemplo, proteínas ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, tienen una secuencia de aminoácido suficientemente idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:13, o 44, o se codifican por una secuencia de nucleótido suficientemente idéntica a la SEQ ID NO:4, 43, o 45. Como se utiliza aquí, el término "suficientemente idéntica" se refiere un primer aminoácido o secuencia de nucleótido que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácido idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar) o nucleótidos a un segundo aminoácido o secuencia de nucleótido de tal manera que el primer y segundo aminoácido o secuencia de nucleótidos presentan dominios estructurales comunes o los motivos y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, el aminoácido o las secuencias de nucleótido que presentan los dominios estructurales comunes tiene por lo menos 30%, 40%, o 50% de identidad, preferiblemente 60% de identidad, más preferiblemente 70%- 80%, y aún más preferiblemente 90-95% de identidad a través de la secuencia de aminoácidos de los dominios y contienen por lo menos uno y preferiblemente dos dominios estructurales o los motivos, se definen aquí como suficientemente idénticos. Adicionalmente, el aminoácido o las secuencias de nucleótido que presentan por lo menos 30%, 40%, o 50%, preferiblemente 60%, más preferiblemente 70-80%, o 90-95% de identidad y presentan una actividad funcional común se definen aquí como suficientemente idénticos.

Como se utiliza intercambiamente aquí, una "actividad ICK", "actividad biológica de ICK" o "actividad funcional de ICK", se refiere a una actividad ejercida por una proteína ICK, polipéptido o molécula de ácido nucleico en un tejido o célula que responde a ICK, o en un sustrato de proteína ICK, como se determina in vivo, o in vitro, de acuerdo con técnicas estándar. En una realización, una actividad de ICK es una actividad directa, tal como una asociación con una molécula objetivo ICK, por ejemplo, un CDK o una molécula de ciclina: Tales interacciones se han demostrado experimentalmente en la invención actual. Como se utiliza aquí, una "molécula objetivo" o "patrón de unión" es una molécula con la cual una proteína ICK se une o interactúa en la naturaleza, de tal manera que se logra la función mediada por ICK. Una molécula objetivo OCK puede ser una molécula no ICK, por ejemplo, un CDK o una molécula de ciclina, o una proteína ICK o polipéptido como se describe aquí. En una realización de ejemplo, una molécula objetivo ICK es un ligando ICK. Alternativamente, una actividad de ICK es una actividad indirecta, tal como una actividad de señalización celular mediada por la interacción de la proteína ICK con un ligando ICK. Las actividades biológicas de ICK se describen aquí. Por ejemplo, las proteínas ICK como se describe aquí pueden tener una o más de las siguientes actividades: (1) ellos pueden inhibir la actividad de CDK (por ejemplo, actividad de ciclina-CDK); (2)



5 ellos pueden regular el ensamble de complejo ciclina-CDK; (3) ellos pueden regular las células concomitantes para dividir, por ejemplo, al integrar señales mitogénicas y antimitogénicas; (4) ellos pueden regular la progresión del ciclo celular; (5) ellos pueden regular la replicación del ADN y/o la reparación del ADN; (6) ellos pueden regular la transcripción de gen; (7) ellos pueden regular la degradación de la ciclina; (8) ellos pueden estar involucrados en el retiro del ciclo celular y/o la diferenciación celular; (9) ellos pueden regular la muerte celular, por ejemplo, apoptosis; (10) ellos pueden controlar el tamaño del órgano (por ejemplo, órgano de planta) y/o organismo (por ejemplo, organismo de de planta); y (11) ellos pueden regular la endoreduplicación.

10 De acuerdo con lo anterior, también se describen proteínas ICK aisladas y polipéptidos que tiene una actividad de ICK. Las proteínas preferidas son proteínas ICK, por ejemplo, las proteínas ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, que tiene por lo menos uno o más de los siguientes dominios: un motivo 1, un motivo 2, un motivo 3, un motivo 4, un motivo 5, un motivo 6, una secuencia Cy, una secuencia de localización nuclear, o una secuencia PEST, alargamientos  $\alpha$ -helicoidales extensivos, por ejemplo, entre los motivos 5 y 6, entre los motivos 6 y 4, y entre los motivos 4 y 3, y, preferiblemente, una actividad de ICK.

15 Las proteínas preferidas adicionales, por ejemplo, las proteínas ICK de una planta monocotiledónea tal como arroz, tienen por lo menos uno o más de los siguientes dominios: un motivo 1, un motivo 2, un motivo 3, un motivo 4, un motivo 5, un motivo 6, una secuencia Cy, una secuencia de localización nuclear, o una secuencia PEST, alargamientos  $\alpha$ -helicoidales extensivos, por ejemplo, entre los motivos 5 y 6, entre los motivos 6 y 4, y entre los motivos 4 y 3, y, preferiblemente, se codifican por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que hibrida bajo condiciones de hibridación exigentes a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:4, 43, o 45.

20 Las secuencias de la presente invención se resumen adelante, en la Tabla 4.

Tabla 4

CLON	ORGANISMO	SECUENCIA DE ADN	SECUENCIA DE PROTEÍNA
OsICK1 (AQ574895)	Oryza sativa	2	11
OsICK2	Oryza sativa	1 (longitud parcial) 9 (longitud completa)	10
OsICK3 (AQ365042)	Oryza sativa	3	12
OsICK4 (AC069145)	Oryza sativa	4(longitud parcial) 43 (longitud completa) 45 (fragmento genómico)	13 (longitud parcial) 44 (longitud completa)
OsICK5 (AP003525)	Oryza sativa	54 (cADN predicho) 56 (fragmento genómico)	55 (proteína predicha)
ZmICK1 (AI737717)	Zea mays	5	14
ZmICK2 (AW267370)	Zea mays	6	15
SbICK (AF061282)	Sorgo bicolor	7	16
PtICK (AA556411)	Pinus taeda	8	17

Varios aspectos de la invención se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones:

#### I. Usos y Métodos de la presente especificación

5 Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteína, y anticuerpos que se describen aquí se pueden utilizar en métodos agrícolas y ensayos de detección. Las moléculas de ácido nucleico aislado como se describe aquí se pueden utilizar, por ejemplo, para expresar una proteína ICK (por ejemplo, por medio de un vector de expresión recombinante en una célula anfitriona), para detectar el mRNA ICK (por ejemplo, en una muestra biológica) o una alteración genética en un gen ICK, y para modular la actividad de ICK, como se describe adicionalmente adelante. Las proteínas ICK se pueden utilizar para tratar trastornos caracterizados por producción insuficiente o excesiva de un sustrato ICK o la producción de inhibidores ICK. Adicionalmente, las proteínas ICK se pueden utilizar para detectar los sustratos ICK de ocurrencia natural, para detectar fármacos o los compuestos que modulan la actividad de ICK, así como también para tratar trastornos caracterizados por producción insuficiente o excesiva de proteína ICK o la producción de formas de proteína ICK que se ha reducido o la actividad aberrante comparado con la proteína tipo natural ICK. Más aún, los anticuerpos anti-ICK como se describe aquí se pueden utilizar para detectar y aislar las proteínas ICK, regular la biodisponibilidad de las proteínas ICK, y modular la actividad de ICK.

#### A. Usos Agrícolas:

20 La presente especificación que también describe un método se proporciona para modificar el destino de la célula y/o desarrollo de planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica y/o fisiología que comprende la modificación de la expresión en células, tejidos u órganos particulares de una planta, de una secuencia genética que codifica un ICK, por ejemplo, un ICK conectado operablemente con una secuencia promotora operable de planta.

25 La modulación de la expresión en una planta de un ICK o un homólogo, análogo o su derivado como se describe aquí puede producir un rango de fenotipos deseables en plantas, tal como, por ejemplo, la modificación de una o más características morfológicas, bioquímicas o fisiológicas que incluye: (i) modificación de la longitud de la fase G1 y/o la fase S y/o la fase G2 y/o la fase M del ciclo celular de una planta; (ii) modificación de la transición de fase G1/S y/o S/G2 y/o G2/M y/o M/G1 de una célula de planta; (iii) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la división celular; (iv) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la replicación del ADN; (v) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de los conjuntos de semillas y/o tamaño de semilla y/o desarrollo de semilla; (vi) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la formación de tubérculo; (vii) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la formación de frutos; (viii) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la formación de hojas; (ix) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de iniciación y/o desarrollo de brotes; (x) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de iniciación y/o desarrollo raíces; (xi) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de iniciación y/o desarrollo lateral de raíz; (xii) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de formación de nódulo y/o función de nódulo; (xiii) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de la formación de arbustos la planta; (xiv) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de enanismo en la planta; (xv) modificación de la iniciación, promoción, estimulación o mejoramiento de envejecimiento; (xvi) modificación de espesor del tallo y/o características de alargamiento y/o resistencia al viento del tallo y/o longitud del tallo; (xvii) modificación de la tolerancia y/o resistencia a la tensión biótica tal como infección de patógeno; y (xviii) modificación de tolerancia y/o resistencia a la tensión abiótica tal como tensión de sequía o tensión de sal.

45 Los métodos para efectuar la expresión de un ICK o un homólogo, análogo o su derivado como se describe aquí en una célula de planta, tejido u órgano, incluyen la introducción de la proteína directamente a una célula, tejido u órgano tal como mediante microinyección de medios balísticos o, alternativamente, la introducción de una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína dentro de la célula, tejido u órgano en un formato que se puede expresar. Los métodos para efectuar la expresión de un ICK o un homólogo, análogo o su derivado como se describe aquí en plantas completas incluyen la regeneración de plantas completas de las células transformadas en las que una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína se introduce en un formato que se puede expresar.

50 La presente especificación también describe cualquier planta producida por el método que se describe aquí, y cualquiera y todas las partes de planta y sus propágulos. La presente especificación también describe la progenie derivada de una célula primaria transformada o transfectada, tejido, órgano o planta completa que se ha producido mediante el método, el único requerimiento es que la progenie exhibe las mismas características genotípicas y/o fenotípicas como aquellas características que se han producido en el progenitor mediante el desarrollo del método.

55 Explotar las funciones de ICK de planta para regular el crecimiento de la planta y el desarrollo puede depender de los métodos que comprenden mejoramiento de la expresión de gen ICK o la expresión ectópica de los genes ICK.

Por ejemplo, un método para explotar la función ICK de planta comprende la supresión de la expresión de gen ICK, así, mejorando el control negativo en la progresión del ciclo celular y el control positivo en la diferenciación celular.

5 La presente especificación que también describe el índice de progresión del ciclo celular se modifica mediante la regulación descendente de la expresión de una proteína ICK de planta o un homólogo o su derivado como se describe aquí. Las moléculas ICK interactúan con e inhiben la actividad de las moléculas de control del ciclo celular, por ejemplo, quinasas o ciclinas de proteína relacionadas con Cdc2. De acuerdo con lo anterior, los niveles  
10 reducidos de las moléculas ICK resulta en una aceleración significativa de la progresión del ciclo celular. La regulación descendente de la expresión de ICK puede promover y extender la actividad de la división celular en células que llegan a estar normalmente inactivas durante el curso del desarrollo y/o como una consecuencia de condiciones de crecimiento adversas y/o como una consecuencia de condiciones de tensión. La regulación descendente de la expresión de ICK, así, se puede esperar que incremente la frecuencia de la formación de órganos laterales que incluye hojas (que resulta en formación de arbustos incrementada), flores (que resultan en números de semillas o vainas de semilla incrementados) y raíces (que resultan en números de raíces laterales incrementados).  
15 El tiempo de formación de órganos laterales también se puede alterar, por ejemplo, que resulta en florecimiento temprano. Otro efecto esperado del retraso de células que llegan a estar inactivas es la ocurrencia retrasada del envejecimiento. La regulación descendente de la expresión de ICK se espera adicionalmente que mejore el crecimiento bajo condiciones de, por ejemplo, tensiones de sal o sequía.

20 Cuando la regulación descendente de la expresión de ICK ocurre en el nivel de planta completa, se espera un efecto de mejoramiento del crecimiento general, es decir, las plantas recombinantes crecerán más rápido y/o alcanzarán un tamaño mayor. Esto es particularmente útil para incrementar la producción de, por ejemplo, plantas de forraje, plantas de follaje, plantas leguminosas, y plantas que producen madera. Alternativamente, la regulación descendente de la expresión de ICK en el nivel de planta completa puede resultar en los efectos de mejoramiento de crecimiento local, por ejemplo, debido a la expresión local y la expresión específica de las proteínas de célula de planta específicamente objetivadas por dicho ICK. Cuando la regulación descendente de la expresión de ICK se confina a células únicas, tejidos, u órganos de una planta, el efecto de mejoramiento del crecimiento se confinará a células únicas, tejidos u órganos de la planta. Son particularmente útiles las restricciones de la regulación descendente de la expresión de ICK a los tejidos u órganos que incluyen semillas, frutos, tubérculos, raíces, brotes, tallos, y nódulos para incrementar la producción y/o tamaño de estos tejidos u órganos.

25 La presente especificación también describe la regulación descendente de la expresión de una proteína ICK o un homólogo o su derivado como se define aquí, en una célula de planta y/o tejido y/u órgano para obtener crecimiento mejorado y/o envejecimiento retrasado de la célula de planta y/o tejido y/u órgano, o para obtener la formación mejorada de los órganos laterales de la planta tejido y/u órgano.

30 En otra realización preferida la regulación descendente de la expresión de una proteína ICK o un homólogo o su derivado como se define aquí, en una planta completa resulta en crecimiento mejorado y/o en frecuencia incrementada de la formación de órganos laterales y/o envejecimiento retrasado de la planta.

35 Las células de planta en las que se subregula la expresión de un ICK se espera adicionalmente que se estimule a través de los ciclos de endoreduplicación, es decir, pasaje a través de los ciclos celulares consecutivos que incluyen la replicación del ADN pero sin intervenir la citoquinesis. Las células que experimentan endoreduplicación, así, llegan a ser poliploides.

40 La regulación descendente de la expresión de ICK se puede utilizar adicionalmente para incrementar la producción de semilla y/o tamaño de semilla. La producción de grano en las plantas de cultivo es largamente una función de la cantidad de almidón producido en la endosperma de la semilla. La cantidad de proteína producida en la endosperma también es un factor que contribuye a la producción de grano (Traas et al. (1998) Current Opin. Plant Biol. 1, 498-503). En contraste, el embrión y las capas de aleurona contribuyen poco en términos del peso total del grano maduro. Por virtud de estar vinculado a la expansión celular y la actividad metabólica, la endoreduplicación generalmente se considera que es un factor importante para incrementar la producción. Como el desarrollo de endosperma de grano incluye inicialmente endoreduplicación extensa (Olsen et al. (1999) Trends Plant Sci. 4, 253-257), que mejora, promueve o estimula este proceso es común que resulte en producción incrementada del grano. La división celular mejorada, promovida o estimulada durante el desarrollo de semilla como se describe supra es una forma alternativa para incrementar la producción de grano. La presente especificación también describe un método para la producción de SiO<sub>2</sub> de las cáscaras o las cáscaras de semillas de arroz más grandes. Los métodos para la extracción y/o la producción de SiO<sub>2</sub> puro de cáscaras o cáscaras de semilla de arroz son conocidos en la técnica (por ejemplo Gorthy and Pudukottah 1999) y son bien establecidas las unidades para la producción de SiO<sub>2</sub> de cáscaras de semilla de arroz (visitar por ejemplo <http://bisnis.doc.gov/bisnis/leads/990604sp.html>). El SiO<sub>2</sub> tiene muchas aplicaciones que incluye electrónicos, industria de perfume y farmacología y producción de silicona.  
55

La presente especificación también describe la regulación descendente específica de tejidos, específicas de etapas desarrollada, específica de etapa de ciclo celular de la expresión de una proteína ICK o un homólogo o su derivado

- 5 como se define aquí. La regulación descendente de la expresión de ICK se puede obtener al utilizar las secuencias de nucleótido que distinguen los transcritos poliadenilados alternativamente de ICK (ver Ejemplo 4). Este método tiene ventajas potenciales tal como, por ejemplo, el hecho que se puede utilizar un promotor constitutivo para subregular la expresión de ICK en lugar de un promotor específico de tejido, específico de etapas desarrolladas o específico de fase de ciclo celular.
- 10 Preferiblemente, la progresión del índice de ciclo celular se modifica significativamente mediante la expresión ectópica de una proteína ICK o un homólogo o su derivado como se define aquí. Como las moléculas ICK interactúan con e inhiben la actividad del control de ciclo celular, por ejemplo, las moléculas CDK, que elevan los niveles de ICK resulta en una inhibición significativa de la progresión del ciclo celular. Así, se pueden esperar efectos opuestos a aquellos que se pueden obtener como se describe para la regulación descendente de la expresión de ICK. Estos efectos opuestos tienen aplicaciones útiles como se describe infra. La expresión ectópica de ICK en el nivel de planta completa, por ejemplo, puede crear enanismo. La expresión ectópica de ICK en células específicas, tejidos u órganos se puede utilizar para inhibir la formación de brote lateral en cultivos tal como tomate. La expresión ectópica de ICK también puede conferir resistencia mejorada a los patógenos originando crecimiento neoplásico de la planta, tal como bacterias patogénicas de planta que incluye *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians*, *Pseudomonas savastnoi*, *Xanthomonas campestris pv citri* y *Erwinia herbicola*, hongo patógeno de planta que incluye *Plasmodiophora brassicae*, *Crinipellis perniciosus*, *Pucciniastrum geoppertianum*, *Taphrina wiesneri*, *Ustilaga maydis*, *Exobasidium vaccinii*, *E. camelliae*, *Entorrhiza casparyana* y *Apiosporina morbosum*.
- 15 La expresión ectópica de una molécula ICK también puede conferir resistencia mejorada o tolerancia contra los patógenos que depende de los eventos de endoreduplicación en las células anfitrionas infectadas para sobrevivir. Se espera que la expresión ectópica de ICK inhiba los eventos de endoreduplicación. Los patógenos que dependen de la endoreduplicación de células anfitrionas, por ejemplo, para establecer una estructura de alimentación, incluyen nemátodos tal como especies *Heterodera* y especies *Meloidogyne*.
- 20 Como se utiliza aquí, los términos "expresión ectópica" o "sobrexpresión ectópica" de un gen o una proteína se refiere a los patrones de expresión y/o los niveles de expresión del gen o proteína que no ocurre normalmente bajo condiciones naturales.
- 25 Por "destino de célula y/o desarrollo de planta y/o morfología de la planta y/o bioquímica y/o fisiología" significa que una o más características fisiológicas y/o bioquímicas y/o morfológicas y/o desarrolladas de una planta se alteran mediante el desarrollo de una o más etapas como se describe aquí.
- 30 "destino de célula " incluye características celulares o de tipo celular de una célula particular que se producen durante el desarrollo de planta o su proceso celular, en particular durante el ciclo celular o como una consecuencia de un proceso de ciclo celular.
- 35 El término "desarrollo de planta" o el término "característica de desarrollo de planta" o términos similares, cuando se utiliza aquí, se deben tomar que significan cualquier proceso celular de una planta que se involucra en determinar el destino desarrollado de una célula de planta, en particular el tejido específico o tipo de órgano en el cual se desarrollará una célula progenitora. Los procesos celulares relevantes para el desarrollo de planta se conocerán por aquellos expertos en la técnica. Tales procesos incluyen, por ejemplo, morfogenia, fotomorfogenia, desarrollo de brote, desarrollo de raíz, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, elongación del tallo, florecimiento, y mecanismos reguladores involucrados en la determinación del destino de la célula, en particular un proceso o proceso regulador que involucra el ciclo celular.
- 40 El término "morfología de la planta" o el término "característica morfológica de planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá por aquellos expertos en la técnica por incluir la apariencia externa de una planta, que incluye una cualquiera o más características estructurales o combinación de sus características estructurales. Tales características estructurales incluyen la forma, tamaño, número, posición, color, textura, disposición, y patronamiento de cualquier célula tejido u órgano o grupos de células, tejidos u órganos de una planta, que incluye la raíz, tallo, hoja, brote, peciolo, tricoma, flores, pétalos, estigma, pistilo, estambre, polen, óvulo, semilla, embrión, endosperma, recubrimiento de semilla, aleurona, fibra, fruto, cámbium, madura, duramen, parenquima, aerenquima, elemento de tamiz, floema o tejido vascular.
- 45 El término "bioquímica de la planta" o el término "característica bioquímica de planta" o términos similares, cuando se utiliza aquí, se entenderán por aquellos expertos en la técnica que incluyen los procesos metabólicos o catalíticos de una planta, que incluye el metabolismo primario y secundario y sus productos, que incluye cualesquier moléculas pequeñas, macromoléculas o compuestos químicos, tal como pero no limitado a almidones, azúcares, proteínas, péptidos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de ácido nucleico, celulosas, hemicelulosas, calosas, lectinas, fibras, pigmentos tal como antocianinas, vitaminas, minerales, micronutrientes, o macronutrientes,
- 50 ques e producen por las plantas.
- 55

5 El término "fisiología de la planta" o el término "característica fisiológica de la planta" o término similar, cuando se utiliza aquí, se entenderá que incluye procesos funcionales de una planta, que incluye los procesos desarrollados tal como crecimiento, expansión y diferenciación, desarrollo sexual, reproducción sexual, conjuntos de semillas, desarrollo de semilla, relleno de grano, reproducción asexual, división celular, inactividad, germinación, adaptación de la luz, fotosíntesis, expansión de la hoja, producción de fibra, crecimiento secundario, o producción de madera, entre otros; las respuestas de una planta a factores aplicados externamente tal como metales, químicos, hormonas, factores de crecimiento, factores ambientales y de tensión ambiental (por ejemplo, anoxia, hipoxia, temperatura alta, temperatura baja, deshidratación, luz longitud del día, inundaciones, sal, metales pesados, entre otros), que incluye respuestas adaptativas de las plantas a dichos factores aplicados externamente.

10 Las moléculas ICK como se describe aquí son útiles en la agricultura. Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteína, y anticuerpos que se describen aquí se pueden utilizar para modular los niveles de proteína o la actividad de una proteína involucrada en el ciclo celular, por ejemplo, proteínas involucradas en la transición de G1/S y/o G2/M en el ciclo celular.

15 Así, las moléculas ICK como se describe aquí se pueden utilizar para modular, por ejemplo, mejorar, la producción de cultivos; modular, por ejemplo, atenuar, la tensión, por ejemplo, el calor o carencia del nutriente, tolerancia; modular la tolerancia a las plagas y enfermedades; modular la arquitectura de la planta; modular los rasgos de calidad de la planta; o modular la reproducción de la planta y desarrollo de semilla.

20 Las moléculas ICK como se describe aquí también se pueden utilizar para modular la endoreduplicación en células almacenadas, tejidos almacenados, y/o órganos almacenados de plantas o sus partes. El término "endoreduplicación" incluye replicación recurrente del ADN sin mitosis y citoquinesis consecuente. Los órganos de almacenamiento objetivo preferidos y sus partes para la modulación de endoreduplicación son, por ejemplo, semillas (tal como de cereales, cultivos de semilla de aceite), raíces (tal como en remolacha), tubérculos (tal como en papas) y frutos (tal como en vegetales y especies de frutos). La endoreduplicación incrementada en los órganos almacenados, y sus partes, se correlaciona con capacidad de almacenamiento mejorada y, así, con producción mejorada. En otra realización de la invención, se modula la endoreduplicación de una planta completa.

#### B. Ensayos de Detección:

30 La especificación también describe un método (también denominado aquí como un "ensayo de detección") para identificar moduladores, es decir, compuestos de prueba o candidatos o agentes (por ejemplo, péptidos, imitadores de péptido, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a las proteínas ICK, tiene un efecto inhibitorio o estimulador en, por ejemplo, la expresión de ICK o la actividad de ICK, o tienen un efecto inhibitorio o estimulador en, por ejemplo, la expresión o actividad de un sustrato ICK.

35 La especificación también describe ensayos para detectar los compuestos de prueba o candidato que son sustratos de una proteína ICK o polipéptido o su porción biológicamente activa. La especificación también describe ensayos para detectar los compuestos de prueba o candidato que se unen a o modulan la actividad una proteína ICK o polipéptido o su porción biológicamente activa, por ejemplo, modular la capacidad del ICK para interactuar con su ligando cognato. Los compuestos de prueba como se describe aquí se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos métodos en métodos de colección combinatorial conocidos en la técnica, que incluye: colecciones biológicas; colecciones de fase de solución o de fase sólida paralela espacialmente direccionable; métodos de colección sintética que requieren desconvolución; el método de colección una perla-un compuesto; y métodos de colección sintética utilizando selección de cromatografía de afinidad. El método de colección biológica se limita a colecciones de péptido, mientras que los otros cuatro métodos se pueden aplicar a las colecciones de péptido, no péptido, oligómero o molécula pequeña de los compuestos (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

45 Ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones moleculares se puede encontrar en la técnica, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y en Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

50 Las colecciones de los compuestos se pueden presentar en la solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o en glóbulos (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), fichas (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5,223,409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) o en fago (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirila et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner supra.).

55 En otra realización, un ensayo es un ensayo con base en célula que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula objetivo ICK (por ejemplo, una quinasa dependiente de ciclina de planta) con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo estimular o inhibir) la

actividad de la molécula objetivo ICK. Determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad una molécula objetivo ICK se puede llevar a cabo, por ejemplo, al determinar la capacidad del la proteína ICK para unirse a o interactuar con la molécula objetivo ICK, o al determinar la capacidad de la molécula objetivo, por ejemplo, la quinasa dependiente de ciclina de planta, para fosforilar una proteína.

- 5 La capacidad de la molécula objetivo, por ejemplo, la quinasa dependiente de ciclina de planta, para fosforilar una proteína se puede determinar mediante, por ejemplo, en ensayo de quinasa in vitro. En resumen, una proteína se puede incubar con la molécula objetivo, por ejemplo, la quinasa dependiente de ciclina de planta, y ATP radioactivo, por ejemplo, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, en un amortiguador que contiene MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub>, por ejemplo, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 mM de MnCl<sub>2</sub>. Luego de la incubación, la proteína inmunoprecipitada se puede separar mediante de electroforesis de gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones de reducción, transferir a una membrana, por ejemplo, una membrana PVDF, y autoradiografiar. La apariencia de las bandas detectables en la autoradiografía indica que la proteína se ha fosforilado. El análisis de fosfoaminoácido del sustrato fosforilado también se puede desarrollar con el fin de determinar que residuos se fosforilan en la proteína. En resumen, la banda de proteína radiofosforilada se puede apartar del gel SDS y se somete a hidrólisis de ácido parcial. Los productos luego se pueden separar mediante electroforesis unidimensional y se analizan en, por ejemplo, un Phosphorimager y se compara con estándares de fosfoaminoácido teñido con ninhidrina.

- 20 Determinar la capacidad de la proteína ICK para unirse a o interactuar con una molécula objetivo ICK se puede llevar a cabo al determinar la unión directa. Determinar la capacidad de la proteína ICK para unirse a o interactuar con una molécula objetivo ICK se puede llevar a cabo, por ejemplo, al acoplar la proteína ICK con un radioisótopo o marca enzimática de tal manera que la unión de la proteína ICK a una molécula objetivo ICK se puede determinar al detectar la proteína marcada ICK en un complejo. Por ejemplo, las moléculas ICK, por ejemplo, proteínas ICK, se pueden marcar con <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, o <sup>3</sup>H, directamente o indirectamente, y el radioisótopo detectado mediante conteo directo de radioemisión o mediante conteo de centelleo. Alternativamente, las moléculas ICK se pueden marcar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y la marca enzimática detectada mediante la determinación de conversión de un sustrato apropiado para el producto.

- 30 La presente especificación también describe para determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre ICK y su molécula objetivo, sin la marca de cualquiera de los interactuadores. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la interacción de ICK con su molécula objetivo sin la marca de ICK o la molécula objetivo. McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912. Como se utiliza aquí, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Citosensor) es un instrumento analítico que mide el índice en el cual una célula acidifica su ambiente utilizando un sensor potenciométrico direccionable a la luz (LAPS). Los cambios en el índice de acidificación se pueden utilizar como un indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

- 35 En una realización preferida, determinar la capacidad de la proteína ICK para unirse a o interactuar con una molécula objetivo ICK se puede llevar a cabo al determinar la actividad de la molécula objetivo. Por ejemplo, la actividad de la molécula objetivo se puede determinar al detectar la inducción de un segundo mensajero celular objetivo, detectar la actividad catalítica/enzimática del sustrato objetivo apropiado, detectar la inducción de un gen reportero (que comprende un elemento regulador de respuesta objetivo ligado operablemente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, acetil transferasa cloramfenicol), o detectar una respuesta celular regulada por objetivo.

- 40 En todavía otra realización, un ensayo descrito aquí es un ensayo de célula libre en el cual se pone en contacto una proteína ICK o su porción biológicamente activa con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba para unirse a la proteína ICK o su porción biológicamente activa. La unión del compuesto de prueba a la proteína ICK se puede determinar directamente o indirectamente como se describió anteriormente. En una realización preferida, el ensayo incluye poner en contacto la proteína ICK o su porción biológicamente activa con un compuesto conocido que se une a ICK para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína ICK, en donde determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína ICK comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse preferencialmente a ICK o su porción biológicamente activa cuando se compara con el compuesto conocido.

- 50 En otra realización, el ensayo es un ensayo libre de célula en el cual se pone en contacto una proteína ICK o su porción biológicamente activa con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad la proteína ICK o su porción biológicamente activa. Determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de una proteína ICK se puede llevar a cabo, por ejemplo, al determinar la capacidad del la proteína ICK para unirse a una molécula objetivo ICK mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. Determinar la capacidad del la proteína ICK para unirse a una molécula objetivo ICK también se puede llevar a cabo utilizando una tecnología tal como Análisis de Interacción Biomolecular en tiempo real (BIA). Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345 y Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705. Como se utiliza aquí, "BIA" es una tecnología

para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar cualquiera de los interactuadores (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón de superficie (SPR) se pueden utilizar como una indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas.

5 En una realización alternativa, determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad una proteína ICK se puede llevar a cabo al determinar la capacidad del la proteína ICK para modular adicionalmente la actividad una molécula objetivo ICK (por ejemplo, un componente de ruta de transducción de señal mediada por ICK). Por ejemplo, la actividad de la molécula efectora en un objetivo apropiado se puede determinar, o la unión del efector a un objetivo apropiado se puede determinar como se describió previamente.

10 En todavía otra realización, el ensayo libre de célula involucra poner en contacto una proteína ICK o su porción biológicamente activa con un compuesto conocido que se une a la proteína ICK para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la proteína ICK, en donde determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la proteína ICK comprende determinar la capacidad del la proteína ICK para unir preferiblemente a o modular la actividad una molécula objetivo ICK.

15 Los ensayos libres de célula que se describen aquí son susceptibles a utilizar las formas vinculas a membrana y/o solubles de proteínas (por ejemplo, proteínas ICK o sus porciones biológicamente activas). En el caso de ensayos libres de célula en los cuales se utiliza la forma vinculada a membrana que forma una proteína puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de tal manera que la forma vinculada a membrana de la proteína se mantiene en la solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tal como noctilglucosida, n-dodecilglucosida, n-dodecilmaltosida, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoli(etilenglicol éter)<sub>n</sub>, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]- 1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-3-ammonio-1-propano sulfonato.

25 En más de una realización de los métodos de ensayo anteriores de la presente invención, puede ser deseable inmovilizar ICK o su molécula objetivo para facilitar la separación de las formas complejadas o no complejadas de una o ambas proteínas, así como también para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a una proteína ICK, o la interacción de una proteína ICK con una molécula objetivo en la presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede llevar a cabo en un recipiente adecuado que contiene los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtítulo, tubos de prueba, y tubos de microcentrifuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que agrega un dominio que permite unirse a una o ambas proteínas a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutationa-S-transferasa/ ICK o las proteínas de fusión glutationa-S-transferasa/objetivo se pueden adsorber en glóbulos de glutationa sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtítulo derivadas de glutationa, que luego se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y la proteína objetivo no adsorbida o proteína ICK, y la mezcla se incuba bajo condiciones que conducen a la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Luego de incubación, se lavan estos glóbulos o pozos de placa de microtítulo para remover cualesquier componentes no vinculados, la matriz se inmoviliza en el caso de glóbulos, el complejo se determina directamente o indirectamente, por ejemplo, como se describió anteriormente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de la unión o actividad de ICK se determina utilizando técnicas estándar.

40 Otras técnicas para inmovilizar las proteínas en matrices también se puede utilizar en los ensayos de detección de la invención. Por ejemplo, se puede inmovilizar una proteína ICK o una molécula objetivo ICK utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. La proteína ICK biotinilada o las moléculas objetivo se pueden preparar de biotin-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas bien conocidas en el arte (por ejemplo, equipo de biotinización, Pierce Chemical, Rockford, IL), y se inmovilizan en los pozos de placas de 96 pozos recubiertas con estreptidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que reaccionan con la proteína ICK o las moléculas objetivo pero que no interfieren con la unión de la proteína ICK a su molécula objetivo se pueden derivar en los pozos de la placa, y la proteína ICK u objetivo vinculado se atrapa en los pozos de conjugación de anticuerpo. Los métodos para detectar tales complejos, en adición a aquellos descritos anteriormente para los complejos inmovilizados GST, incluyen inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con la proteína ICK o molécula objetivo, así como también ensayos ligados a enzima que depende de detectar una actividad enzimática asociada con la proteína ICK o molécula objetivo.

55 En otra realización, los moduladores de la expresión ICK se identifican en un método en donde se pone en contacto una célula con un compuesto candidato y se determina la expresión del mARN ICK o la proteína en la célula. El nivel de la expresión del mARN ICK o la proteína en la presencia del compuesto candidato es comparado con el nivel de la expresión del mARN ICK o proteína en la ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato luego se puede identificar como un modulador de la expresión de ICK con base en esta comparación. Por ejemplo, cuando es mayor la expresión del mARN ICK o la proteína (estadísticamente significativamente mayor) en la presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador del mARN ICK

o la expresión de la proteína. Alternativamente, cuando la expresión del mRNA ICK o la proteína es menor (estadísticamente significativamente menor) en la presencia de los compuestos candidatos que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor del mRNA ICK o la expresión de la proteína. El nivel del mRNA ICK o la expresión de la proteína en las células se pueden determinar mediante los métodos descritos aquí para detectar el mRNA ICK o la proteína.

La presente especificación también describe que las proteínas ICK se pueden utilizar como "proteínas de cebo" en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; y Brent WO94/10300), para identificar otros proteínas, que se unen a o interactúan con ICK ("Proteína de unión a ICK" o "ICK-bp") y se involucran en la actividad de ICK. Tal proteína de unión a ICK también son comunes por estar involucrados en la propagación de señales mediante las proteínas ICK o objetivos ICK como, por ejemplo, elementos en la dirección 3' de una ruta de señalización mediada por ICK. Alternativamente, tal proteína de unión a ICK es común por ser inhibidores ICK.

El sistema de dos híbridos es con base en la naturaleza modular de la mayoría de factores de transcripción, que consiste de los dominios de activación y de unión de ADN separables. En resumen, el ensayo utiliza dos construcciones diferentes de ADN. En una construcción, el gen que codifica una proteína ICK se fusiona a un gen que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción, una secuencia de ADN, de una colección de secuencias de ADN, que codifica una proteína no identificada ("presa" o "muestra") se fusiona a un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y la "presa" son capaces de interactuar, in vivo, formando un complejo dependiente de ICK, los dominios de activación y de unión a ADN del factor de transcripción se ponen en proximidad cercana. Esta proximidad permite la transcripción de un gen reportero (por ejemplo, LacZ) que se liga operablemente a un sitio regulador transcripcional responsable del factor de transcripción. La expresión del gen reportero se puede detectar y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional se pueden aislar y utilizar para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interactúa con la proteína ICK.

La especificación también describe agentes novedosos identificados por los ensayos de detección descritos anteriormente. La especificación también describe para uso adicional un agente identificado como se describe aquí en un modelo de animal o planta apropiado. Por ejemplo, un agente identificado como se describe aquí (por ejemplo, un agente modulador ICK, una molécula de ácido nucleico ICK anticodificante, un anticuerpo específico de ICK, o un patrón de unión ICK) se pueden utilizar en un modelo de planta o animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos colaterales de tratamiento con tal un agente. Alternativamente, un agente identificado como se describe aquí se puede utilizar en un modelo de planta o animal para determinar el mecanismo de acción de tal un agente. La especificación también describe el uso de agentes novedosos identificados por los ensayos de detección descritos anteriormente para los usos agrícolas o terapéuticos descritos aquí.

### C. Ensayos de Detección

Las porciones o fragmentos de las secuencias de cADN identificadas aquí (y las secuencias de gen completas correspondientes) se pueden utilizar en numerosas formas como reactivos de polinucleótido. Por ejemplo, se pueden utilizar estas secuencias para: mapear sus genes respectivos en un cromosoma; y, así, ubicar regiones de gen asociadas con enfermedad genética; identificar un individuo de una muestra biológica de un minuto (tipificación de tejidos); y ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Una vez se ha aislado la secuencia (o una porción de la secuencia) de un gen, esta secuencia se puede utilizar para mapear la ubicación del gen en un cromosoma. Este proceso se denomina mapeo de cromosoma. De acuerdo con lo anterior, las porciones o fragmentos de las secuencias de nucleótido ICK, que se describen aquí, se pueden utilizar para mapear la ubicación de los genes ICK en un cromosoma. El mapeo de las secuencias ICK a los cromosomas es una primera etapa importante en correlacionar estas secuencias con genes asociados con la enfermedad.

En resumen, se pueden mapear los genes ICK en cromosomas al preparar los cebadores PCR (preferiblemente 15-25 bp en longitud) de las secuencias de nucleótido ICK. Los análisis por computador de las secuencias ICK se pueden utilizar para predecir los cebadores que no envergan más de un exón en el ADN genómico, complicando así el proceso de amplificación. Estos cebadores luego se pueden utilizar para detección PCR de los híbridos celulares que contienen cromosomas humanos o de plante individuales. Solo aquellos híbridos que contienen el gen de planta o humano que corresponde a las secuencias ICK producirán un fragmento amplificado.

Otras estrategias de mapeo que se pueden utilizar de forma similar para mapear una secuencia ICK en su cromosoma incluyen hibridación in situ (descrita en Fan, Y. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27), predetección con cromosomas de flujo etiquetados, ordenados, y preselección mediante hibridación en colecciones de cADN específicas de cromosoma.



La hibridación de fluorescencia in situ (FISH) de una secuencia de ADN para una metafase cromosómica rociada se puede utilizar adicionalmente para proporcionar una ubicación cromosómica precisa en una etapa. Se pueden hacer rociados de cromosoma utilizando células cuya división se ha bloqueado en metafase mediante un químico tal como colcemid que interrumpe el huso mitótico. Los cromosomas se pueden tratar en resumen con tripsina, y luego se tiñen con Giemsa. Un patrón de bandas de luz y oscuridad se desarrolla en cada cromosoma, ya que se pueden identificar individualmente los cromosomas. La técnica de FISH se puede utilizar con una secuencia de ADN tan corta como 500 o 600 bases. Sin embargo, los clones más largos de 1,000 bases tiene una alta probabilidad de la unión a una ubicación cromosómica única con suficiente intensidad de señal para detección simple. Preferiblemente 1,000 bases, y más preferiblemente 2,000 bases serán suficientes para obtener buenos resultados en una cantidad razonable de tiempo. Para una revisión de esta técnica, ver Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988).

Los reactivos para el mapeo cromosómico se pueden utilizar individualmente para marcar un cromosoma único o un sitio único en el que el cromosoma, o los paneles de reactivos se pueden utilizar para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas. Los reactivos que corresponden a regiones no codificantes de los genes se prefieren actualmente para propósitos de mapeo. Las secuencias codificantes son comúnmente más conservados dentro de las familias de gen, incrementando así el cambio de hibridaciones cruzadas durante mapeo cromosómico.

Una vez se ha mapeado una secuencia para una ubicación cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma se puede correlacionar con datos de mapa genético. (Tales datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man, disponibles en línea a través de Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre un gen y una enfermedad, mapeada con la misma región cromosómica, luego se puede identificar a través del análisis de ligado (coherencia de los genes físicamente adyacentes), descritos en, por ejemplo, Egeland, J. et al. (1987) Nature, 325: 783-787.

Más aún, se pueden determinar las diferencias en las secuencias de ADN entre las plantas afectadas y no afectadas con una enfermedad asociada con el gen ICK. Si se observa una mutación en algunas o todas las plantas no afectadas, entonces la mutación es comúnmente el agente causador de la enfermedad particular. La comparación de plantas afectadas y no afectadas involucra generalmente la primera búsqueda de alteraciones estructurales en los cromosomas, tal como eliminaciones translocaciones que son visibles de rociados de cromosoma o detectables utilizando PCR con base en aquella secuencia de ADN. Finalmente, el secuenciamiento completo de los genes de varias plantas se puede desarrollar para confirmar la presencia de una mutación y para distinguir las mutaciones de los polimorfismos.

## II. Moléculas de Ácido Nucleico Aislado

La presente especificación también describe las moléculas de ácido nucleico aislado que codifican las proteínas ICK o sus porciones biológicamente activas, así como también los fragmentos de ácido nucleico suficientes para uso como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican ICK (por ejemplo, el mRNA ICK) y fragmentos para uso como cebadores PCR para la amplificación o mutación de las moléculas ICK de ácido nucleico. Como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" está destinado a incluir moléculas de ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, mRNA), oligonucleótidos de ARN/ADN quimérico, y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislar" incluye moléculas de ácido nucleico que se separan del cromosoma con el cual se asocia naturalmente el ADN genómico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de las secuencia que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico ICK aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótido que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. Más aún, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cADN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente.

Una molécula de ácido nucleico como se describe aquí, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:43, o 45, o su porción, se puede aislar utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada aquí. Por ejemplo, utilizando toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:4, o 45, como una sonda de hibridación, las moléculas ICK de ácido nucleico se puede aislar utilizando técnicas de clonación e hibridación estándar (por ejemplo, como se describe en

Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5 Más aún, una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una porción de la SEQ ID NO:4, 43, o 45, se puede aislar mediante la reacción de cadena polimerasa (PCR) utilizando cebadores de oligonucleótido sintéticos diseñados con base en la secuencia de la SEQ ID NO:4, 43, o 45, respectivamente.

10 Un ácido nucleico como se describe aquí se puede amplificar utilizando cADN, mRNA o alternativamente, ADN genómico, como una plantilla y cebadores de oligonucleótido apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación de PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y se caracteriza por análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los oligonucleótidos que corresponden a las secuencias ICK de nucleótido se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

Una molécula de ácido nucleico aislada como se describe aquí puede comprender la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43, o 45.

15 Una molécula de ácido nucleico aislada como se describe aquí puede comprender una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43, o 45, o una porción de cualquiera de estas secuencias de nucleótido. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43, o 45, es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43, o 45, respectivamente, de tal manera que esta se puede hibridar a la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43, o 45, respectivamente, que forma por lo tanto un dúplex estable.

20 Una molécula de ácido nucleico aislada como se describe aquí puede comprender una secuencia de nucleótido que es por lo menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la secuencia de nucleótido (por ejemplo, a la longitud completa de la secuencia de nucleótido) mostrada en la SEQ ID NO: 4, 43, o 45, o una porción de cualquiera de estas secuencias de nucleótido.

25 Más aún, la molécula de ácido nucleico como se describe aquí puede comprender solo una porción de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:4, 43, o 45, por ejemplo un fragmento que se puede utilizar como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de una proteína ICK. La secuencia de nucleótido determinada de la clonación del gen ICK permite la generación de sondas y cebadores designados para uso en identificar y/o clonar otros miembros de la familia ICK, así como también homólogos ICK de otras especies.

30 La sonda/cebador típicamente comprende oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido típicamente comprende una región de la secuencia de nucleótido que hibrida bajo condiciones exigentes en por lo menos aproximadamente 12 o 15, preferiblemente aproximadamente 20 o 25, más preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o 75 nucleótidos consecutivos de una secuencia codificante de la SEQ ID NO:4, 43 o 45 o de un mutante o variante alélica de ocurrencia natural de la SEQ ID NO: 4, 43, o 45. En una realización de ejemplo,

35 una molécula de ácido nucleico como se describe aquí comprende una secuencia de nucleótido que es por lo menos 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o 800 nucleótidos en longitud e hibrida bajo condiciones de hibridación exigentes a una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, 43 o 45.

40 Las sondas con base en las secuencias de nucleótido ICK se pueden utilizar para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican la misma o proteínas homólogos. En realizaciones preferidas, la sonda comprende adicionalmente su grupo marcado adherido, por ejemplo, el grupo marcado puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de enzima. Tales sondas se pueden utilizar como una parte de equipo de prueba diagnóstica para identificar células o tejidos que expresan erróneamente una proteína ICK, tal como al medir un nivel de un ácido nucleico que codifica el ICK en una muestra de células de un sujeto por ejemplo, detectar los niveles de mRNA ICK o determinar si ha mutado o eliminado un gen ICK genómico.

45 Un fragmento de ácido nucleico que codifica una "porción biológicamente activa de una proteína ICK" se puede preparar al aislar una porción de la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica ICK (las actividades biológicas de las proteínas ICK se describen aquí), que expresa la porción codificada de la proteína ICK (por ejemplo, mediante expresión recombinante in vitro) y evalúa la actividad de la porción codificada de la proteína ICK.

50 La presente especificación describe adicionalmente moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43 o 45, debido a la degeneración del código genético y, así, codificar las mismas proteínas ICK como aquellas codificadas de la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO:4, 43 o 45. En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada como se describe aquí tiene una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ICK.

En adición a las secuencias de nucleótido ICK mostradas en la SEQ ID NO:4, 43 o 45, se apreciará por aquellos expertos en la técnica que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácido de las proteínas ICK pueden existir dentro de una población (por ejemplo, una población de plantas de arroz). Tal polimorfismo genético en los genes ICK puede existir entre los individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Como se utiliza aquí, los términos "gen" y "gen recombinante" se refiere a moléculas de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierta que codifica una proteína ICK, preferiblemente una proteína de planta ICK, y puede incluir adicionalmente secuencias reguladoras no codificante, y intrones. Tales variaciones alélicas naturales que incluyen las proteínas ICK funcionales y no funcionales y que típicamente pueden resultar en 1-5% de varianza en la secuencia de nucleótido de un gen ICK. La presente especificación también describe cualquiera y todas las variaciones de nucleótido y resulta en polimorfismos de aminoácido en genes ICK que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de una proteína ICK.

Las variantes alélicas naturales incluyen adicionalmente moléculas que comprenden polimorfismos de nucleótido únicos (SNP) así como también polimorfismos de inserción/eliminación pequeños (INDEL; el tamaño de los INDEL es usualmente menor de aproximadamente 100 bp). Los SNP y los INDEL forman el conjunto más grande de las variantes de secuencia en las cepas polimórficas de ocurrencia natural de la mayoría de organismos. Ellos son útiles en mapear los genes y en el descubrimiento de genes y funciones de genes. Ellos son adicionalmente útiles en la identificación del locus genético, por ejemplo, genes de planta, involucrados en determinar los procesos tal como índice de crecimiento, tamaño de planta y producción de planta, vigor de la planta, resistencia a la enfermedad, tolerancia a la tensión y similares. Muchas técnicas están disponibles hoy en día para identificar los SNP y/o los INDEL que incluye (i) PCR seguido por cromatografía líquida de alto desempeño desnaturalizada (DHPLC; por ejemplo, Cho et al. (1999) *Nature Genet* 23, 203-207); (ii) electroforesis capilar desnaturalizada constante (CDCE) combinada con PCR de alta fidelidad (por ejemplo, Li-Sucholeiki et al. (1999) *Electrophoresis* 20, 1224-1232); (iii) electroforesis de gel de gradiente desnaturalizante (Fischer y Lerman (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1579-1583); (iv) espectrometría de masa de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS; por ejemplo, Ross et al (2000) *Biotechniques* 29, 620-629); (v) ensayos PCR de monitoreo de fluorescencia en tiempo real (Tapp et al (2000) *Biotechniques* 28, 732-738); (vi) tecnología de gel Acrydite™ (Kenney et al (1998) *Biotechniques* 25; 516-521); (vii) impresión manual de ciclo dideoxi (CddF; Langemeier et al (1994) *Biotechniques* 17, 484-490); (viii) análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) (Vidal-Puig y Moller (1994) *Biotechniques* 17, 490-496) y (ix) reacción de extensión de cebador de minisequenciamiento (Syvanen (1999) *Hum Mutat* 13, 1-10). La técnica de 'Lesiones Locales Inducidas por Objetivo en los Genomas' (TILLING; McCallum et al. (2000) *Nat. Biotechnol* 18, 455-457; *Plant Physiol* 123, 439-442), que es una variante de (i) supra, también se puede aplicar para identificar rápidamente un gen alterado en, por ejemplo, individuos de planta químicamente mutagenizados que muestran fenotipos interesantes.

Las diferencias en el codón preferido utilizado se ilustran adelante para *Agrobacterium tumefaciens* (una bacteria), *A. thaliana*, *M. sativa* (dos plantas dicotiledóneas) y *Oryza sativa* (una planta monocotiledónea). Por ejemplo, el codón GGC (para glicina) es el codón más frecuentemente utilizado en *A. tumefaciens* (36.2 ‰), es el segundo codón más frecuentemente utilizado en *O. sativa* pero se utiliza en frecuencias mucho inferiores en *A. thaliana* y *M. sativa* (9 ‰ y 8.4 ‰, respectivamente). De los cuatro codones posibles que codifican el codón de glicina GGC se utiliza más preferiblemente en *A. tumefaciens* y *O. sativa*. Sin embargo, en *A.*

El codón *thaliana* GGA (y GGU) se utiliza más preferiblemente, aunque en *M. sativa* el codón GGU (y GGA) se utiliza más preferiblemente.

Más aún, las moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia ICK y, así, que tiene una secuencia de nucleótido que difiere de las secuencias ICK de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, también se describen aquí. Por ejemplo, se puede identificar otro cADN ICK con base en la secuencia de nucleótido de las moléculas de planta ICK que se describen aquí. Más aún, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas ICK de diferentes especies y, así, que tienen una secuencia de nucleótido que difiere de las secuencias ICK de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, también se describen aquí. Por ejemplo, se puede identificar un cADN ICK de maíz con base en la secuencia de nucleótido de un ICK de arroz.

Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a las variantes alélicas naturales y los homólogos de los cADN ICK de la invención se pueden aislar con base en su homología para los ácidos nucleicos ICK descritos aquí utilizando los cADN descritos aquí, o su porción, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación estándar bajo condiciones de hibridación exigentes.

De acuerdo con lo anterior, también se describe una molécula de ácido nucleico aislada que es por lo menos 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos en longitud e hibrida bajo condiciones exigentes en la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 4, 43 o 45. En otra realización, el ácido nucleico es por lo menos 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, o 600 nucleótidos en longitud. Como se utiliza aquí, el término "hibrida bajo condiciones exigentes" está destinado a describir condiciones para hibridación y lavado bajo aquellas secuencias de nucleótido por lo menos 30%, 40%, 50%, o 60% idénticas una a la otra que

- permanecen típicamente hibridadas una a la otra. Preferiblemente, las condiciones son de tal manera que las secuencias por lo menos aproximadamente 70%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85% o 90% idénticas una a la otra que permanecen típicamente hibridadas una a la otra. Tales condiciones exigentes son conocidas por aquellos expertos en la técnica y se puede encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo no limitante, preferido de condiciones de hibridación exigentes son la hibridación en 6X de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0.2 X SSC, 0.1% de SDS a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0.2 X SSC, 0.1% de SDS a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 60°C, y aún más preferiblemente a 65°C. Los rangos intermedios a los valores mencionados anteriormente, por ejemplo, a 60-65 °C o a 5-60°C también se describen aquí. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida bajo condiciones exigentes a la secuencia de la SEQ ID NO: 4, 43 o 45, corresponde a una molécula de ácido nucleico de ocurrencia natural. Como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico de "ocurrencia natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótido que ocurre en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).
- En adición a las variantes alélicas de ocurrencia natural de las secuencias ICK que puede existir en la naturaleza, el artesano experto apreciará adicionalmente que cambios se pueden introducir mediante mutación en la secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, conduciendo por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácido de las proteínas ICK codificadas, sin alterar la capacidad funcional de las proteínas ICK. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótido que conducen a sustituciones de aminoácido en los residuos de aminoácido "no esenciales" se pueden hacer en la secuencia de una proteína ICK. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar de la secuencia tipo natural del ICK sin alterar la actividad biológica, mientras se requiere un aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácido que se conservan entre las proteínas ICK de la presente invención, se predice que son particularmente indómitos a alteración. Adicionalmente, los residuos de aminoácido adicionales que se conservan entre las proteínas ICK de la presente invención y otros miembros de la familia ICK no están muy dispuestos a alteración.

De acuerdo con lo anterior, la especificación también describe moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas ICK que contienen cambios en los residuos de aminoácido que no son esenciales para actividad.

- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína ICK homóloga a las proteínas ICK de la presente invención se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido dentro de la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, de tal manera que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido se introducen dentro de la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir dentro de la SEQ ID NO:4, 43 o 45, mediante técnicas estándar, tal como mutagenia dirigida a sitio y mutagenia mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido conservadoras se hacen en uno o más de los residuos de aminoácido no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en una proteína ICK se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente juntas o parte de una secuencia codificante ICK, tal como mediante mutagenia de saturación, y los mutantes resultantes se pueden detectar para actividad biológica ICK para identificar mutantes que retienen la actividad. Luego de la mutagenia de la SEQ ID NO:43, o 45, la proteína codificada se puede expresar recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína. Alternativamente la corrección de gen in vivo objetivo o la modificación se puede alcanzar mediante oligonucleótidos de ARN/ADN quiméricos (por ejemplo Yoon et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2071-2076).

- Una proteína mutante ICK se puede evaluar por la capacidad de: (1) inhibir la actividad de CDK (por ejemplo, actividad de ciclina-CDK); (2) regular el ensamble de complejo ciclina-CDK; (3) regular las células concomitantes para dividir, por ejemplo, al integrar señales mitogénicas y antimitogénicas; (4) regular la progresión del ciclo celular; (5) regular la replicación del ADN y/o la reparación del ADN; (6) regular la transcripción de gen; (7) regular la degradación de la ciclina; (8) modular el retiro del ciclo celular y/o la diferenciación celular; (9) regular la muerte celular, por ejemplo, apoptosis; (10) tamaño del órgano de control (por ejemplo, órgano de planta) y/u organismo (por ejemplo, órgano de planta); y (11) endoreduplicación regular.

- En adición de las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas ICK descritas anteriormente, la especificación también describe las moléculas de ácido nucleico aislado que son sus anticodificantes. Un ácido nucleico "anticodificante" comprende una secuencia de nucleótido que es complementaria a un ácido nucleico "codificante" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cepa codificante de la molécula de cADN

bicatenaria o complementaria a una secuencia de mRNA. De acuerdo con lo anterior, un ácido nucleico anticodificante puede unir el hidrógeno a un ácido nucleico codificante. El ácido nucleico anticodificante puede ser complementario a una cepa codificante ICK completa, o solo a su porción. En una realización, una molécula de ácido nucleico anticodificante es anticodificante a una "región codificante" de la cepa codificante de una secuencia de nucleótido que codifica ICK. El término "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótido que comprende codones que son traducidos dentro de los residuos de aminoácido. En otra realización, la molécula de ácido nucleico anticodificante es anticodificante para una "región no codificante" de la cepa codificante de una secuencia de nucleótido que codifica ICK. El término "región no codificante" se refiere a las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traduce dentro de los aminoácidos (es decir, también denominado como las regiones no traducidas 5' y 3').

Dadas las secuencias de cepa codificante que codifican el ICK descrito aquí, los ácidos nucleicos anticodificantes de la invención se pueden diseñar de acuerdo con las reglas de par base de Watson y Crick. La molécula anticodificante de ácido nucleico puede ser complementaria a la región codificante completa del mRNA ICK, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es anticodificante para solo una porción de la región codificante o no codificante del mRNA ICK. Por ejemplo, el oligonucleótido anticodificante puede ser complementario a la región del sitio de inicio de traducción circundante del mRNA ICK. Un oligonucleótido anticodificante puede ser, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos en longitud. Un ácido nucleico anticodificante de la invención se puede construir utilizando síntesis química y reacciones de ligado enzimático utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico anticodificante (por ejemplo, un oligonucleótido anticodificante) se puede sintetizar químicamente utilizando los nucleótidos de ocurrencia natural o varios nucleótidos modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos codificante y anticodificante, por ejemplo, derivados fosforotioato y se pueden utilizar nucleótidos sustituidos por acridina. Ejemplos de los nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico anticodificante incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico anticodificante se puede producir biológicamente utilizando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación anticodificante (es decir, el ARN que se transcribe de un ácido nucleico insertado será de una orientación anticodificante para un ácido nucleico objetivo de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección). Preferiblemente, la producción de ácidos nucleicos anticodificantes en plantas ocurre por medio de un transgen establemente integrado que comprende un promotor operativo en plantas, un oligonucleótido anticodificante, y un terminador.

Otras modificaciones de nucleótido conocidas incluyen metilación, ciclización y 'tapas' y sustitución de uno o más de los nucleótidos de ocurrencia natural con un análogo tal como inosina. Las modificaciones de los nucleótidos incluyen la adición de acridina, amina, biotina, cascada azul, colesterol, Cy3®, Cy5®, Cy5.5® Dabcil, digoxigenina, dinitrofenilo, Edans, 6-FAM, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, fosfato de psoralen, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCA-S®, SE, BODIPY®, Marina Blue®, Pacific Blue®, Oregon Green®, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, Rhodol Green® y Texas Red®. Las modificaciones de estructura de polinucleótido incluyen metilfosfonato, 2'-OMe-metilfosfonato RNA, fosfortiorato, ARN, 2'-OMeARN. Las modificaciones base incluyen 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA(cordicepina), 7-desaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N6-Me-dA, sitio abásico (dEspaciador), biotina dT, 2'-OMe-5Me-C, 2'-OMe-propinil-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-I-dC, 5-Me-dC, 5-F-dC, carboxi-dT, dA convertible, dC convertible, dG convertible, dT convertible, dU convertible, 7-deaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O6-Me-dG, S6-DNP-dG, 4-metil-indol, 5-nitroindol, 2'-OMe-inosina, 2'-dl, O6-fenil-dl, 4-metil-indol, 2'-desoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP(análogo purina), dK(análogo pirimidina), 3-nitropirrol, 2-tio-dT, 4-tio-dT, biotindT, carboxi-dT, O4-Me-dT, O4-triazol dT, 2'-OMe-propinil-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-I-dU, O4-triazol dU.

Las moléculas de ácido nucleico anticodificantes que se describen aquí se introducen típicamente dentro de una planta o se administran a un sujeto o se generan in situ de tal manera que ellos hibridan con o se unen al mRNA celular y/o ADN genómico que codifica una proteína ICK para inhibir por lo tanto la expresión de la proteína, por ejemplo, al inhibir la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser mediante la complementariedad de nucleótido convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico anticodificante que se une a los dúplex de ADN, a través de las interacciones específicas en la estría principal de la hélice doble. Un ejemplo de una ruta de introducción o administración de las moléculas de ácido nucleico anticodificantes de la invención incluyen la transformación en una planta o inyección directa en un sitio de tejido en un sujeto. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico anticodificantes se pueden modificar para células seleccionadas objetivo y luego se administran sistémicamente. Por ejemplo, para administración sistémica, las

moléculas anticodificantes se pueden modificar de tal manera que ellos se unen específicamente a los receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al ligar las moléculas de ácido nucleico anticodificantes a péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores o antígenos de superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico anticodificantes también se pueden suministrar a las células utilizando los vectores que se describen aquí. Para lograr suficientes concentraciones intracelulares de las moléculas anticodificantes, se prefieren las construcciones de vector en las que la molécula de ácido nucleico anticodificante se coloca bajo el control de un promotor constitutivo o un promotor pol II o pol III fuerte.

En todavía otra realización, la molécula de ácido nucleico anticodificante que se describe aquí es una molécula de ácido nucleico  $\alpha$ -anomérica. Una molécula de ácido nucleico  $\alpha$ -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, contrario a las unidades  $\beta$  usuales, las cepas corren paralelas una a la otra (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico anticodificante también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330). En otra realización, la molécula de ácido nucleico anticodificante comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico codificante complementaria a la molécula de ácido nucleico anticodificante. Los métodos de silenciamiento de gen con base en tales moléculas de ácido nucleico son bien conocidos por aquellos expertos (por ejemplo, Grierson et al. (1998) WO 98/53083; Waterhouse et al. (1999) WO 99/53050).

En todavía otra realización, un ácido nucleico anticodificante como se describe aquí es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de dividir un ácido nucleico monocatenario, tal como un mARN, al cual ellos tienen una región complementaria. Así, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo (descritas en Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) se pueden utilizar para dividir catalíticamente los transcritos de mARN ICK para inhibir por lo tanto la traducción del mARN ICK. Una ribozima que tiene especificidad para un ácido nucleico que codifica el ICK se puede diseñar con base en la secuencia de nucleótido de un cADN ICK descrito aquí (es decir, SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 43, 45, 54 o 56). Por ejemplo, se puede construir un derivado de ARN Tetrahimena L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótido del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótido a ser dividida en un mARN que codifica ICK. Ver, por ejemplo, Cech et al. Patente Estadounidense No. 4,987,071; y Cech et al. Patente Estadounidense No. 5,116,742. Alternativamente, el mARN ICK se puede utilizar para seleccionar ARN catalítico que tiene una actividad de ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418. El uso de ribozimas para la inactivación del gen en plantas se conocen en la técnica (por ejemplo, Atkins et al. (1994) WO 94/00012; Lenne et al. (1995) WO 95/03404; Lutziger et al. (2000) WO 00/00619; Prinsen et al. (1997) WO 97/13865 y Scott et al. (1997) WO/ 97/38116).

Alternativamente, la expresión de gen ICK se puede inhibir al objetivar secuencias de nucleótido complementarias a la región reguladora del ICK (por ejemplo, el promotor y/o mejoradores de ICK) para formar estructuras helicoidales triples que evitan la transcripción del gen ICK en células objetivo. Ver generalmente, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

En todavía otra realización, las moléculas ICK de ácido nucleico como se describe aquí se pueden modificar en el grupo funcional base, grupo funcional de azúcar o estructura de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura de desoxirribosa fosfato de las moléculas de ácido nucleico se puede modificar para generar los ácidos nucleicos de péptido (ver Hyrup B. et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Química* 4 (1): 5-23). Como se utiliza aquí, los términos "ácidos nucleicos de péptido" o "PNA" se refieren a imitadores de ácido nucleico, por ejemplo, imitadores de ADN, en los que se reemplaza la estructura de fosfato de desoxirribosa por una estructura de pseudopéptido y solo se retienen las cuatro nucleobases naturales. La estructura neutra de los PNA se ha mostrado que permite la hibridación específica al ADN y ARN bajo condiciones de resistencia iónica baja. La síntesis de los oligómeros de PNA se puede desarrollar utilizando protocolos de síntesis de péptido de fase sólida estándar como se describe en Hyrup B. et al. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14670-675.

Los PNA de las moléculas ICK de ácido nucleico se pueden utilizar para incrementar la producción de cultivo en plantas o en aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Por ejemplo, los PNA se pueden utilizar como agentes de antígeno o anticodificantes para la modulación específica de secuencia de la expresión de gen al, por ejemplo, inducir la replicación de inhibir o disminuir la transcripción o traducción. Los PAN de las moléculas ICK de ácido nucleico también se pueden utilizar en el análisis de mutaciones de par base únicas en un gen, (por ejemplo, mediante sujeción de PCR dirigido a PNA); como 'enzimas de restricción artificiales' cuando se utiliza en combinación con otras enzimas, (por ejemplo, nucleasas S1 (Hyrup B. (1996) *supra*)); o como sondas o cebadores para el secuenciamiento o hibridación de ADN (Hyrup B. et al. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).

Los PNA de ICK se pueden modificar, (por ejemplo, para mejorar su estabilidad o recaptación celular), al adherir grupos lipófilos u otros grupos auxiliares para PNA, mediante la formación de quimeras PNA-ADN, o mediante el uso

de liposomas u otras técnicas de suministro de fármaco conocidas en la técnica. Por ejemplo, las quimeras de PNA-ADN de las moléculas ICK de ácido nucleico se pueden generar ya que ellas pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permite las enzimas de reconocimiento de ADN, (por ejemplo, RNAsa H y polimerasas de ADN), para interactuar con la porción de ADN mientras que la porción de PNA proporcionaría alta afinidad o especificada de unión. Las quimeras de PNA-ADN se pueden ligar utilizando ligadores de longitudes apropiadas seleccionadas en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación (Hyrup B. (1996) supra). La síntesis de las quimeras PNA-ADN se puede desarrollar como se describe en Hyrup B. (1996) supra y Finn P.J. et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63. Por ejemplo, se puede sintetizar una cadena de ADN en un soporte sólido utilizando la química de acoplamiento fosforamidita estándar y análogos de nucleosida modificados, por ejemplo, 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita, se pueden utilizar como el PNA y el extremo 5' de ADN (Mag, M. et al. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). Los monómeros PNA luego se acoplan en una manera en forma de etapas para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA 5' y un segmento de ADN 3' (Finn P.J. et al. (1996) supra). Alternativamente, se pueden sintetizar moléculas quiméricas con un segmento de ADN 5' y un segmento de PNA 3' (Peterser, K.H. et al. (1975) *Bioorganic Med Chem. Lett.* 5: 1119-11124).

El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tal como péptidos (por ejemplo, para receptores de célula anfitriona objetivo in vivo), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; Publicación PCT No. W088/09810) o la barrera de sangre-cerebro (ver, por ejemplo, Publicación PCT No. W089/10134). Adicionalmente, se pueden modificar los oligonucleótidos con agentes de división activados por hibridación (Ver, por ejemplo, Krol et al. (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) o agentes intercalantes. (Ver, por ejemplo, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, (por ejemplo, un péptido, agente reticulado activado por hibridación, agente de transporte, o agente de división activado por hibridación).

### 25 III. Proteínas ICK aisladas y Anticuerpos Anti-ICK

La presente especificación también describe proteínas ICK aisladas, y sus porciones biológicamente activas, así como también fragmentos de polipéptido adecuados para uso como inmunógenos para elevar los anticuerpos anti-ICK. En una realización, las proteínas ICK nativas se pueden aislar de las células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteína estándar. En otra realización, se producen proteínas ICK mediante técnicas de ADN recombinantes. Alternativo a la expresión recombinante, una proteína ICK o polipéptido se puede sintetizar químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptido estándar.

Una proteína "aislada" o "purificada" o su porción biológicamente activa es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido de la cual se deriva la proteína ICK, o sustancialmente libre de los precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de la proteína ICK en las que se separa la proteína de los componentes celulares de las células de las cuales este se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, el lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína ICK que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso seco) de proteína no ICK (también denominadas aquí como una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de proteína no ICK, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de proteína no ICK, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de proteína no ICK. Cuando la proteína ICK o su porción biológicamente activa se produce recombinantemente, también está preferiblemente sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de la proteína.

El lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos" incluye preparaciones de proteína ICK en las que se separa la proteína de los precursores químicos u otros químicos que se involucran en la síntesis de la proteína. En una realización, el lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos" incluye preparaciones de proteína ICK que tiene menos de aproximadamente 30% (por peso seco) de precursores químicos o no químicos ICK, más preferiblemente menos de aproximadamente 20% precursores químicos o no químicos ICK, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10% precursores químicos o no químicos ICK, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% precursores químicos o no químicos ICK.

Las porciones biológicamente activas de una proteína ICK incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácido suficientemente homólogas a o derivadas de la secuencia de aminoácido de la proteína ICK, que incluyen menos aminoácidos que las proteínas ICK de longitud completa, y exhiben por lo menos una actividad de una proteína ICK. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad de la proteína ICK. Una porción biológicamente activa de una proteína ICK puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, por lo menos 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos en longitud.

- Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácido o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, los espacios se pueden introducir en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden ignorar para propósitos de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es por lo menos 30%, preferiblemente por lo menos 40%, más preferiblemente por lo menos 50%, aún más preferiblemente por lo menos 60%, y aún más preferiblemente por lo menos 70%, 80%, o 90% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido correspondientes o las posiciones de nucleótido. Cuando se ocupa una posición de la secuencia cebadora por lo mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas a aquella posición (como se utiliza aquí "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico"). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas presentadas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita ser introducido para alineación óptima de las dos secuencias.
- La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácido se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un longitud en peso de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En todavía otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de nucleótido se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de de espacio de 40, 50, 60, 70, o 80 y un longitud en peso de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.
- El ácido nucleico y las secuencias de proteína de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para desarrollar una búsqueda contra la base de datos pública para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden desarrollar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótido BLAST se puede desarrollar con el programa NBLAST, clasificación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótido homólogas a las moléculas ICK de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden desarrollar con el programa XBLAST, clasificación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácido homólogas a proteína las moléculas ICK de la invención. Para obtener las alineaciones en espacio para propósitos de comparación, el BLAST en espacio se puede utilizar como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utiliza BLAST y los programas BLAST en espacio, se pueden utilizar los parámetros de penalidad de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- La presente especificación también describe las proteínas de fusión ICK o quiméricas. Como se utiliza aquí, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" ICK comprende un polipéptido ICK ligado operativamente a un polipéptido no ICK. Un "polipéptido ICK" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que corresponde un ICK, en donde un "polipéptido no ICK" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la proteína ICK, por ejemplo, una proteína que es diferente de la proteína ICK y que se deriva del mismo o un organismo diferente. El polipéptido no ICK, por ejemplo, puede ser etiqueta (histidina)<sub>6</sub>, glutationa S-transferasa, proteína A, proteína de unión a maltosa, dihidrofolato reductasa, epítipo de Etiqueta•100 (EETARFQPGYRS; SEQ ID NO:37), epítipo c-myc (EQKLISEEDL; SEQ ID NO:38), epítipo FLAG® (DYKDDDK; SEQ ID NO:39), lacZ, CMP (péptido de unión a calmodulina), epítipo HA (YPYDVPDYA; SEQ ID NO:40), epítipo de proteína C (EDQVDPRLIDGK; SEQ ID NO:41) o epítipo VSV (YTDIEMNRLGK; SEQ ID NO:42).
- Dentro de una proteína de fusión ICK el polipéptido ICK puede corresponder a toda o una porción de una proteína ICK. Una proteína de fusión ICK puede comprender por lo menos una porción biológicamente activa de una proteína ICK o por lo menos dos porciones biológicamente activas de una proteína ICK. Dentro de la proteína de fusión, el término "ligado operativamente" está destinado a indicar que el polipéptido ICK y el polipéptido no ICK se fusionan en estructura uno al otro. El polipéptido no ICK se puede fusionar al terminal N o al terminal C del polipéptido ICK.
- Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión GST-ICK en la cual se fusionan las secuencias ICK al Terminal C de las secuencias GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación del ICK recombinante.
- La proteína de fusión puede ser una proteína ICK que contiene una secuencia de señal heteróloga en su Terminal N. En ciertas células anfitrionas (por ejemplo, células anfitrionas de planta o de mamífero), la expresión y/o secreción del ICK se puede incrementar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.



Las proteínas de fusión ICK como se describe aquí se pueden incorporar dentro de las composiciones farmacéuticas y se administra a una planta o un sujeto in vivo. Las proteínas de fusión ICK se pueden utilizar para afectar la biodisponibilidad de un sustrato ICK. El uso de las proteínas de fusión ICK puede ser útil agrícolamente para el incremento de la producción de cultivos o terapéuticamente para el tratamiento de trastornos relacionados con el crecimiento celular, por ejemplo, cáncer. Más aún, las proteínas de fusión ICK como se describe aquí se pueden utilizar como inmunógenos para producir los anticuerpos anti-ICK en un sujeto, para purificar los ligandos ICK y en detectar los ensayos para identificar las moléculas que modulan la interacción de ICK con un sustrato ICK, por ejemplo, una molécula CDK o una molécula de ciclina.

Preferiblemente, una proteína de fusión o quimérica ICK como se describe aquí se produce mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptido se ligan en estructura de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo al emplear terminales de extremo romo o de extremo escalonado para ligado, digestión de restricción de enzima para proporcionar el Terminal apropiado, relleno de los extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable. El gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, la amplificación PCR de los fragmentos de gen se puede llevar a cabo utilizando los cebadores de ancho que surgen como salientes complementarias entre los dos fragmentos de gen consecutivos que se pueden hibridar posteriormente y se reamplifican para generar una secuencia de gen quimérico (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Más aún, muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles ya que codifican un grupo funcional de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica ICK se puede clonar dentro de tal un vector de expresión de tal manera que el grupo funcional de fusión se liga en estructura a la proteína ICK.

La presente especificación también describe variantes de las proteínas ICK cuya función como agonistas ICK (imitadores) o como antagonistas ICK. Las variantes de las proteínas ICK se pueden generar mediante mutagenia, por ejemplo, mutación de punto discreto o truncación de una proteína ICK. Un agonista de las proteínas ICK puede retener la misma, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma de ocurrencia natural de una proteína ICK. Un antagonista de una proteína ICK puede inhibir uno o más de las actividades de la forma de ocurrencia natural de la proteína ICK al, por ejemplo, modular competitivamente una actividad celular de una proteína ICK. Así, se pueden provocar los efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma de ocurrencia natural de la proteína tiene pocos efectos colaterales en un sujeto con relación al tratamiento con la forma de ocurrencia natural de la proteína ICK.

En una realización, las variantes de una proteína ICK que funcionan como agonistas ICK (imitadores) o como antagonistas ICK se pueden identificar al detectar colecciones combinatoriales de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncación, de una proteína ICK para la actividad agonista o antagonista de la proteína ICK. En una realización, una colección variegada de variantes ICK se genera mediante mutagenia combinatorial en el nivel de ácido nucleico y se codifica por una colección de gen variegada. Una colección variegada de variantes ICK se puede producir, por ejemplo, al ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos dentro de las secuencias de gen de tal manera que un conjunto degenerado de las secuencias ICK potenciales se puede expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de las proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para exhibición de fago) que contiene el conjunto de secuencias ICK aquí. Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir colecciones de variantes ICK potenciales de una secuencia de oligonucleótido degenerada. La síntesis química de una secuencia de gen degenerada se puede desarrollar en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético liga dentro de un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de las secuencias ICK potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477.

Adicionalmente, las colecciones de los fragmentos de una secuencia codificante de proteína ICK se pueden utilizar para generar una población variegada de los fragmentos ICK para detectar y seleccionar posteriormente las variantes de una proteína ICK. En una realización, una colección de los fragmentos de secuencia codificantes se puede generar al tratar un fragmento PCR bicatenario de una secuencia codificante ICK con una nucleasa bajo condiciones en donde se corta ocurre solo aproximadamente una vez por molécula, ADN bicatenario desnaturalizado, el ADN renaturalizado para formar el ADN bicatenario que puede incluir los pares codificante/anticodificante de diferentes productos cortados, remover las porciones monocatenarias de los dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligar la colección de fragmento resultante dentro de un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una colección de expresión que codifica los fragmentos internos y de terminal N y de terminal C de varios tamaños de la proteína ICK.

Se conocen varias técnicas en el arte para detectar los productos de gen de colecciones combinatoriales hechas mediante mutaciones de punto o truncación, y para detectar las colecciones de cADN para los productos de gen que tiene una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para la detección rápida de las colecciones de gen

mediante la mutagenia combinatorial de las proteínas ICK. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son fáciles para análisis de alto rendimiento, para detectar colecciones de gen grandes típicamente incluyen clonar la colección de gen dentro de los vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la colección resultante de los vectores, y expresar los genes combinatoriales bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detecta. La Mutagenia de Ensamble Recursiva (REM), una nueva técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las colecciones, se puede utilizar en combinación con los ensayos de detección para identificar las variantes ICK (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Los ensayos con base en célula se pueden explotar para analizar una colección ICK variegada. Por ejemplo, se puede transfectar una colección de los vectores de expresión en una estirpe celular que sintetiza ordinariamente y secreta el ICK. Las células transfectadas luego se cultivan de tal manera que el ICK y un mutante ICK particular se secretan y se puede detectar el efecto de la expresión del mutante en la actividad de ICK en los sobrenadantes celulares, por ejemplo, mediante cualquiera de un número de ensayos enzimáticos. El ADN de plásmido luego se puede recuperar de las células cuya clasificación para inhibición, o alternativamente, la potenciación de la actividad de ICK, y los clones individuales se caracterizan adicionalmente.

Una proteína ICK aislada, o una porción o su fragmento, se pueden utilizar como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a ICK utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpo policlonal y monoclonal. Una proteína ICK de longitud completa se puede utilizar o, alternativamente, la invención proporciona los fragmentos de péptido antigénico de ICK para uso como inmunógenos. El péptido antigénico de ICK comprende por lo menos 8 residuos de aminoácido y abarca un epítipo de ICK de tal manera que un anticuerpo se eleva contra las formas de péptido de un complejo inmune específico con ICK. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende por lo menos 10 residuos de aminoácido, más preferiblemente por lo menos 15 residuos de aminoácido, aún más preferiblemente por lo menos 20 residuos de aminoácido, y más preferiblemente por lo menos 30 residuos de aminoácido.

Los epítopos preferidos abarcados por el péptido antigénico son regiones de ICK que se ubican en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas.

Se utiliza típicamente un inmunógeno ICK para preparar anticuerpos al inmunizar un sujeto adecuado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína ICK recombinantemente expresada o un polipéptido ICK químicamente sintetizado. La preparación puede incluir adicionalmente un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación ICK inmunogénica induce un respuesta de anticuerpo anti-ICK policlonal.

De acuerdo con lo anterior, la especificación también describe anticuerpos anti-ICK. El término "anticuerpo" como se utiliza aquí se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno, tal como ICK. Los ejemplos de las porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina incluyen los fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que se pueden generar al tratar el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. La especificación describe los anticuerpos policlonal y monoclonal que unen ICK. El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utiliza aquí, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie del sitio de unión a antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular de ICK. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe así típicamente un único sitio de afinidad para una proteína particular ICK con el cual este inmunoreacciona.

Los anticuerpos policlonales anti-ICK se pueden preparar como se describió anteriormente al inmunizar un sujeto adecuado con un inmunógeno ICK. El título de anticuerpo anti-ICK en el sujeto inmunizado se puede monitorear durante el tiempo mediante técnicas estándar, tal como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) utilizando ICK inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra ICK se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y se orifican adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tal como cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. En un tiempo apropiado después de inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-ICK que son células que producen anticuerpo mayores se pueden obtener del sujeto y se utilizan para preparar los anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tal como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497) (ver también, Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; y Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75), la técnica de hibridoma de célula B humana más reciente (Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4:72), la técnica de hibridoma EBV (Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir los hibridomas de anticuerpo monoclonal es bien conocida (ver generalmente R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A.

Lemer (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Geffer et al. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una estirpe celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona a los linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno ICK como se describió anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se detectan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a ICK.

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos para fusionar los linfocitos e inmortalizar las estirpes celulares se pueden aplicar para el propósito de generar un anticuerpo monoclonal anti-ICK (ver, por ejemplo, G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:55052; Geffer et al. *Somatic Cell Genet.*, cited supra; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited supra; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited supra). Más aún, los trabajadores medianamente experto apreciarán que existen muchas variaciones de tales métodos que también serán útiles. Típicamente, la estirpe celular inmortal (por ejemplo, una estirpe celular de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero como los linfocitos. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas de murino al fusionar los linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una estirpe celular de ratón inmortalizada. Las estirpes celulares inmortalizadas preferidas son estirpes celulares de mieloma de ratón para cultivar el medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de un número de estirpes celulares de mieloma se puede utilizar como un patrón de fusión de acuerdo con las técnicas estándar, por ejemplo, las estirpes de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas estirpes de mieloma están disponibles de ATCC. Típicamente, se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT a esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma que resulta de la fusión luego se seleccionan utilizando medio HAT, que mata las células de mieloma fusionados o no fusionados improductivos (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días debido a que ellos no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan mediante la detección de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para los anticuerpos que se unen ICK, por ejemplo, utilizando en ensayo ELISA estándar.

Alternativamente para preparar los hibridomas de secreción del anticuerpo monoclonal, un anticuerpo anti-ICK monoclonal se puede identificar y aislar al detectar una colección de inmunoglobulina combinatorial recombinante (por ejemplo, una colección de exhibición de fago de anticuerpo) con ICK para aislar por lo tanto los miembros de colección de inmunoglobulina que se unen ICK. Los equipos para generar y detectar las colecciones de exhibición de fago están comercialmente disponibles (por ejemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catálogo No. 27-9400-01; y el equipo Stratagene SurfZAP™ Phage Display, Catálogo No. 240612). Adicionalmente, ejemplos de los métodos y los reactivos particularmente fáciles para uso en generar y detectar la colección de exhibición de anticuerpo se puede encontrar en, por ejemplo, Ladner et al. Patente Estadounidense No. 5,223,409; Kang et al. Publicación Internacional PCT No. WO 92/18619; Dower et al. Publicación Internacional PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación Internacional PCT WO 92/20791; Markland et al. Publicación Internacional PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación Internacional PCT WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación Internacional PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación Internacional PCT No. WO 92/09690; Ladner et al. Publicación Internacional PCT No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/chnology* 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-ICK recombinantes, tal como los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, que comprende las porciones humana y no humana, que se pueden hacer utilizando las técnicas de ADN recombinantes estándar se describen en la presente especificación. Tales anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinantes conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Robinson et al. Solicitud Internacional No. PCT/US86/02269; Akira, et al. Solicitud de Patente Europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison et al. Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger et al. Publicación Internacional PCT No. WO 86/01533; Cabilly et al. Patente Estadounidense No. 4,816,567; Cabilly et al. Solicitud de Patente Europea 125,023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter Patente Estadounidense 5,225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; y Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Un anticuerpo anti-ICK (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) se puede utilizar para aislar el ICK mediante técnicas estándar, tal como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-ICK puede facilitar la purificación de ICK natural de las células y de ICK producido recombinantemente expresado en las células anfitrionas. Más aún, un anticuerpo anti-ICK se puede utilizar para detectar proteína ICK (por ejemplo, en un lisato celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y el patrón de la expresión de la proteína ICK. Estas anticuerpos también se pueden utilizar, por ejemplo, para la inmunoprecipitación e inmunolocalización de las

proteínas como se describe aquí así como también para el monitoreo de la síntesis de tales proteínas, por ejemplo, en organismos recombinantes, y para la identificación de los compuestos que interactúan con la proteína como se describe aquí.

5 Los anticuerpos anti-ICK se pueden utilizar diagnósticamente para monitorear los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar al acoplar (es decir, ligar físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo protésico adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

#### 15 IV. Medios Legibles por Computados

El nucleótido o las secuencias de aminoácido como se describe aquí también se proporcionan en una variedad de medios para facilitar su uso. Como se utiliza aquí, "proporciona" se refiere a una fabricación, diferente a una molécula de aminoácido o de ácido nucleico aislada, que contiene un nucleótido o una secuencia de aminoácido como se describe aquí. Tal una fabricación proporciona el nucleótido o las secuencias de aminoácido, o un subconjunto del mismo (por ejemplo, un subconjunto de estructura de lectura abierta (ORI)) en una forma que permite a un artesano experto examinar la fabricación utilizando menos no aplicables directamente para examinar el nucleótido o las secuencias de aminoácido, o un subconjunto del mismo, cuando ellos existen en la naturaleza o en forma purificada.

25 En una aplicación de esta realización, un nucleótido o secuencia de aminoácido como se describe aquí se puede registrar en medio legible por computador. Como se utiliza aquí "medio legible por computador" incluye cualquier medio que se puede leer y acceder directamente mediante un computador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medio de almacenamiento magnético, tal como discos flexibles, medio de almacenamiento de disco duro, y cinta magnética; medio de almacenamiento óptico tal un CD-ROM; medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tal como medio de almacenamiento magnético/óptico. El artesano experto apreciará fácilmente como cualquiera de los medios legibles por computador conocidos actualmente se pueden utilizar para crear una fabricación que comprende el medio legible por computador que ha registrado un nucleótido o secuencia de aminoácido como se describe aquí.

35 Como se utiliza aquí "registrado" se refiere a un proceso de almacenamiento de información en el medio legible por computador. El artesano experto puede adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para registrar la información en un medio legible por computador para generar fabricaciones que comprenden la información del nucleótido o la secuencia de aminoácido como se describe aquí.

40 Una variedad de estructuras de almacenamiento de datos están disponibles para un artesano experto para crear un medio legible por computador que ha registrado un nucleótido o la secuencia de aminoácido como se describe aquí. La elección de la estructura de almacenamiento de datos será generalmente con base en los medio seleccionados para acceder la información almacenada. Adicionalmente, una variedad de programas de procesador de datos y formatos se pueden utilizar para almacenar la información de la secuencia de nucleótido como se describe aquí en el medio legible por computador. La información de secuencia se puede representar en un archivo de texto de procesamiento de palabras, formateados en el software disponible comercialmente tal como WordPerfect y Microsoft Word, o representado en la forma de un archivo ASCII, almacenado en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase Oracle, o similares. El artesano experto puede adaptar fácilmente cualquier número de formatos de estructura de procesamiento de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) con el fin de obtener el medio legible por computador que ha registrado la información de la secuencia de nucleótido como se describe aquí.

50 Al proporcionar el nucleótido o las secuencias de aminoácido como se describe aquí en la forma legible por computador, el artesano experto puede acceder rutinariamente la información de secuencia para una variedad de propósitos. Por ejemplo, un experto en la técnica puede utilizar el nucleótido o las secuencias de aminoácido como se describe aquí en la forma legible por computador para comparar la secuencia objetivo o motivo de estructura objetivo con la información de secuencia almacenada dentro de los medios de almacenamiento de datos. Se utilizan medios de búsqueda para identificar fragmentos o regiones de las secuencias como se describe aquí que se empareja con una secuencia objetivo particular o motivo objetivo.

55 Como se utiliza aquí, una "secuencia objetivo" puede ser cualquier ADN o la secuencia de aminoácido de seis o más nucleótidos o dos o más aminoácidos. Un artesano experto puede reconocer fácilmente que una secuencia objetivo

más larga que es, menos probable que una secuencia objetivo estará presente como una recurrencia aleatoria en la base de datos. La longitud de secuencia más preferida de una secuencia objetivo es de aproximadamente 10 a 100 aminoácidos o forma aproximadamente 30 a 300 residuos de nucleótido. Sin embargo, es bien reconocido que los fragmentos comercialmente importantes, tal como los fragmentos de secuencia involucrados en la expresión de gen y el procesamiento de la proteína, puede ser de longitud más corta.

Como se utiliza aquí, "un motivo estructural objetivo," o "motivo objetivo," se refiere a cualquier secuencia o combinación racionalmente seleccionada de las secuencias en las que las secuencias se seleccionan con base en un configuración tridimensional que se forma luego del plegado del motivo objetivo. Existe una variedad de motivos objetivo conocidos en la técnica. Los motivos de proteína objetivo incluyen, pero no se limitan a, sitios activos de enzima y las secuencias de señal. Los motivos objetivo de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, estructuras de horquilla y elementos de expresión inducible (secuencias de unión de proteína).

El software de computador está públicamente disponible que permite a un artesano experto acceder la información de secuencia en un medio legible por computador para análisis y comparación a otras secuencias. Se describen una variedad de algoritmos conocidos públicamente y una variedad de software disponibles comercialmente para conducir medios de búsqueda y se pueden utilizar en los sistemas con base en computador de la presente invención. Ejemplos de tal software incluyen, pero no se limitan a, MacPatter (EMBL), BLASTN y BASTX (NCBIA).

Por ejemplo, el software que implementa el BLAST (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410) y BLAZE (Brutlag et al. (1993) Comp. Chem. 17:203-207) busca algoritmos en un sistema Sybase que se pueden utilizar para identificar estructuras de abertura abierta (ORF) de las secuencias de la invención que contienen homología a los ORF o las proteínas de otras colecciones. Tales ORF son proteínas que codifican los fragmentos y son útiles en producir proteínas comercialmente importantes tal como la enzima utilizada en varias reacciones y en la producción de metabolitos comercialmente útiles.

Adicionalmente, las estimulaciones de plegado y el rediseño por computador de los motivos estructurales de la proteína de la invención se pueden desarrollar utilizando programas de computador apropiados (Olszewski et al. 1996, Hoffman et al. 1995). El modelamiento por computador del plegamiento de la proteína se puede utilizar para el análisis energético y conformacional del péptido detallado y los modelos de proteína (Monge et al. 1995, Renouf and Hounsell 1995). En particular, se pueden utilizar programas apropiados para la identificación de sitios interactivos de las quinasas dependientes de ciclina y ICK, este ligando u otras proteínas que interactúan mediante búsquedas asistidas por computador para las secuencias de péptido complementarios (Fassina and Melli 1994). Los sistemas de computador apropiados adicionales para el diseño de la proteína y los péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Berry and Brenner (1994), Wodak (1987), Pabo and Suchanek (1986). Los resultados obtenidos del análisis de computador descritos anteriormente se pueden utilizar para, por ejemplo la preparación de imitadores de péptido de la proteína como se describe aquí de fragmentos de los mismos.

Adicionalmente, se puede utilizar una estructura cristalográfica y/o tridimensional de la proteína de la invención para el diseño de inhibidores imitadores de péptido de la actividad biológica de la proteína como se describe aquí (Rose et al. 1996, Rutenber et al. 1996).

#### V. Vectores de Expresión Recombinante y Células Anfitrionas

La especificación también describe vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína ICK (o su porción). Como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que este se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular dentro se pueden ligar los segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales dentro del genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación automática en una célula anfitriona dentro de la cual ellos se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se integran dentro del genoma en una célula anfitriona luego de la introducción en la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma anfitrión. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales ellos se ligan operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, se pueden utilizar el "plásmido" y "vector" intercambiamente como el plásmido que es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se incluyen tales otras formas de los vectores de expresión, tal como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus asociado adeno), que sirven como funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes como se describen aquí comprenden un ácido nucleico como se describe aquí en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, por ejemplo, una célula de planta, que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras,

seleccionadas en la base de las células anfitrionas a ser utilizadas para expresión, que se liga operativamente a la secuencia de ácido nucleico a ser expresada. Dentro de un vector de expresión recombinante, "ligado operablemente" está destinado a significar que la secuencia de nucleótido de interés se liga a las secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótido (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula anfitriona cuando el vector se introduce dentro de la célula anfitriona). El término "secuencia reguladora" está destinada a regular promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Se describen tales secuencias reguladoras, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótido en muchos tipos de célula anfitriona y aquellos que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótido solo en ciertas células anfitrionas (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión vector puede depender de tales factores como la elección de la célula anfitriona a ser transformada, el nivel de la expresión de la proteína deseada, y similares. Los vectores de expresión como se describe aquí se pueden introducir dentro de las células anfitrionas para producir por lo tanto proteínas o péptidos, que incluyen las proteínas de fusión o los péptidos, codificados por los ácidos nucleicos como se describe aquí (por ejemplo, proteínas ICK, formas mutantes de las proteínas ICK, proteínas de fusión, y similares).

Los vectores como se describe aquí comprenden un marcador seleccionable y/o clasificable. Los genes marcadores seleccionables útiles para la selección de las células de planta transformadas, callo, tejido de planta y plantas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y comprenden, por ejemplo, resistencia de antimetabolito como la base de la selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149); npt, que confiere resistencia a la neomicina aminoglicosida, canamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e higr, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber trpB, que le permite a las células utilizar indol en lugar de triptofan; hisD, que le permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); la isomerasa de manosa-6-fosfato que permite a las células utilizar manosa (WO 94/20627) y ODC (ornitina decarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor ornitina decarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o deaminasa de Aspergillus terreus que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Los marcadores de clasificación útiles también se conocen por aquellos expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. Ventajosamente, el marcador es un gen que codifica la luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), la proteína fluorescente verde (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta realización es particularmente útil para detección simple y rápida de las células, tejidos y organismos que contienen un vector como se describe aquí.

Un "promotor de planta" es un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células de planta. Los promotores de planta de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se obtienen de las plantas, virus de planta, y bacterias. Los promotores preferidos pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para mejorar adicionalmente la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de una molécula de ácido nucleico a cual ellos se conectan operablemente. Por ejemplo, los elementos que responden al cobre, que responden al glucocorticoide o que responden a la dexametasona se pueden colocar adyacentes a una secuencia promotora heteróloga que conduce la expresión de una molécula de ácido nucleico para conferir la expresión inducible al cobre, inducible al glucocorticoide, o inducible a la dexametasona respectivamente, en dicha molécula de ácido nucleico. Ejemplos de promotores bajo el control desarrollado incluyen promotores que inicia preferiblemente la transcripción en ciertos tejidos, tal como hojas, raíces, semillas, endospermo, embriones, fibras, vasos de xilema, traqueidas, o esclerenquima. Tales promotores se denominan como "tejido preferido." Los promotores que inicial la transcripción solo en ciertos tejidos se denominan como "tejido específico." Un promotor específico de "tipo celular" conduce principalmente la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor "inducible" es un promotor que está bajo control ambiental. Ejemplos de las condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción de los promotores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas o la presencia de luz. El tejido específico, tejido preferido, tipo celular específico, y promotores inducibles constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo más condiciones ambientales.

La especificación también describe células anfitrionas dentro de las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante como se describe aquí. Los términos "célula anfitriona" y "célula anfitriona recombinante" se utilizan intercambiamente aquí. Se entiende que tales términos no solo se refieren a la célula objeto particular sino a la progenie o progenie potencial de tal una célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones exitosas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula progenitora, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término como se utiliza aquí.

Una célula anfitriona puede ser cualquier célula eucariótica o procarionte. Por ejemplo, una proteína ICK se puede expresar en células de planta, células bacterianas tal como *E. coli*, células de insecto, células de mamífero o levadura (tal como células de ovario de hámster Chino (CHO) o células COS). Otras células anfitrionas adecuadas se conocen por aquellos expertos en la técnica.

5 El vector ADN se puede introducir dentro de células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas de transformación o transfección convencional. Como se utiliza aquí, los términos "transformación" y "transfección" están destinados a referirse a una variedad de técnicas reconocidas en el arte para introducir el ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) dentro de una célula anfitriona, que incluye coprecipitación de fosfato de calcio o de cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Los métodos  
10 adecuados para transformar o transfectar las células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Los medios para introducir un vector de expresión recombinante como se describe aquí dentro de un tejido o células de planta incluyen, pero no se limitan a, la transformación utilizando  $\text{CaCl}_2$  y sus variaciones, en particular el método descrito por Hanahan (J. Mol. Biol. 166, 557-560, 1983), retoma de ADN directa en los protoplastos (Krens et al, Nature 296: 72-74, 1982; Paszkowski et al, EMBO J. 3:2717-2722, 1984), la retoma mediada por PEG a los protoplastos (Armstrong et al, Plant Cell Reports 9: 335-339, 1990) bombardeo de micropartículas, electroporación (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:5824-5828, 1985), microinyección de ADN (Crossway et al., Mol. Gen. Genet. 202:179-185, 1986), bombardeo de micropartículas de explantes de tejido o células (Christou et al, Plant Physiol 87: 671-674, 1988; Klein et al. (1992) Biotechnology 24, 384-386), infiltración en vacío del tejido con ácido nucleico, o en el caso de plantas, transferencia mediada por T-ADN de *Agrobacterium* a la planta tejido como se describe esencialmente por An et al. (EMBO J 4:277-284, 1985), Herrera-Estrella et al. (Nature 303: 209-213, 1983a; EMBO J. 2: 987-995, 1983b; In: Plant Genetic Engineering, Cambridge University Press, N.Y., pp 63-93, 1985), o en el método de planta utilizando *Agrobacterium tumefaciens* tal como aquel descrito por Bechtold et al., (C. R. Acad. Sci. (Paris, Sciences de la vie/ Life Sciences) 316: 1194-1199, 1993) o Clough et al (Plant J. 16: 735-743, 1998). Los métodos para la transformación de las plantas monotiledóneas son bien conocidos en la técnica e incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (Cheng et al. (1997) WO 97/48814; Hansen (1998) WO 98/54961; Hiei et al. (1994) WO 94/00977; Hiei et al. (1998) WO 98/17813; Rikiishi et al. (1999) WO 99/04618; Saito et al. (1995) WO 95/06722), bombardeo de microproyectil (Adams et al. (1999) US 5,969,213; Bowen et al. (1998) US 5,736,369; Chang et al. (1994) WO 94/13822; Lundquist et al. (1999) US 5,874,26S/US 5,990,390; Vasil y Vasil (1995) US 5,405,765; Walker et al. (1999) US 5,955,362), retoma de ADN (Eval et al. (1993) WO 93/181,168), microinyección de células de *Agrobacterium* (von Holt 1994 DE 4309203) y sonicación (Finer et al. (1997) US 5,693,512). El vector de ADN puede comprender adicionalmente un gen marcador seleccionable para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o se transforman con una construcción genética. Los genes marcadores seleccionables adecuados contemplados aquí incluyen la resistencia a la ampicilina (Ampr), gen de resistencia a la tetraciclina (Tcr), el gen de resistencia a la canamicina bacteriana (Kanr), gen de resistencia a fosfotricina, gen de fosfotransferasa a neomicina (nptII), gen de resistencia a higromicina, gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), gen de acetiltransferasa cloranfenicol (CAT), gen de proteína fluorescente verde (gfp) (Haseloff et al, 1997), y gen de luciferasa.

40 Para el bombardeo de micropartículas de las células, una micropartícula se impulsa en una célula para producir una célula transformada. Cualquier metodología de transformación de células balística adecuada y aparato se pueden utilizar para desarrollar la materia objeto descrita en esta especificación. El aparato y los procedimientos de ejemplo se describen por Stomp et al. (Patente Estadounidense No. 5,122,466) y Sanford and Wolf (Patente Estadounidense No. 4,945,050). Cuando se utilizan los procedimientos de transformación balísticos, la construcción de gen puede  
45 incorporar un plásmido capaz de replicar en la célula a ser transformada. Ejemplos de micropartículas adecuadas para uso en tales sistemas incluyen 1 a 5  $\mu\text{m}$  de esferas doradas. La construcción de ADN se puede depositar en la micropartícula mediante cualquier técnica adecuada, tal como mediante precipitación.

Se puede regenerar una planta completa de la célula transformada o transfectada, de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica. El tejido de planta capaz de propagación clonal posterior, mediante organogénia o embriogénia, se puede transformar con una construcción de gen de la presente invención y una planta completa regenerada de la misma. El tejido particular seleccionado variará dependiendo de los sistemas de propagación clonal para, y bien adecuados para, las especies particulares a ser transformadas. Los objetivos de tejido de ejemplo incluyen discos de hoja, polen, embriones, cotiledóneas, hipocotiledóneas, megagametofitos, tejido de callo, tejido meristemático existente (por ejemplo, meristema apical, yemas axilares, y meristemas de raíz), y  
55 tejido de meristema inducido (por ejemplo, meristema cotiledóneo y meristema hipocotiledóneo).

El término "organogénia", como se utiliza aquí, incluye un proceso mediante el cual se desarrolla brotes y raíces secuencialmente de los centros meristemáticos.

El término "embriogenia", como se utiliza aquí, incluye un proceso mediante el cual el desarrollo de raíces y brotes juntos en la forma concertada (no secuencialmente), de células somáticas o gametos.

5 Preferiblemente, la planta se produce de acuerdo con los métodos como se describe aquí al transfectar o transformar la planta con una secuencia genética, o al introducir a la planta una proteína, mediante cualesquier medios reconocidos en la técnica, tal como bombardeo de microproyectil, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium* (que incluye en la transformación de planta), fusión de protoplasto, o electroporación, entre otros. Más preferiblemente la planta se produce mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación agrolística de las plantas, levadura, moho u hongos filamentosos es con base en la transferencia de parte de las secuencias de vector de transformación, llamadas el T-ADN, en el núcleo y en la integración de dicho T-ADN en el genoma de dicho eucarioto.

El término "*Agrobacterium*" como se utiliza aquí, incluye un miembro de las *Agrobacterias*, más preferiblemente *Agrobacterium* o *Rhizobacterium* y más preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*.

15 El término "T-ADN", o "ADN transferido", como se utiliza aquí, incluye el vector de transformación flanqueado por los límites de T-ADN que es, después de la activación de los genes de *Agrobacterium* vir, se corta en los límites de T-ADN y se transfiere como un ADN monocatenario en el núcleo de una célula eucariótica.

20 Como se utiliza aquí, los términos "límites de T-ADN", "región de límite de T-ADN", o "región de límite" incluyen límites de TDNA derecho (RB) o límites de T-ADN izquierdo (LB), que comprenden una secuencia de núcleo flanqueada por una región interna de límite como parte del límite de flaqueo de T-ADN y/o una región externa de límite como parte de la estructura de vector que flanquea el límite. Las secuencias de núcleo comprenden 22 bp en el caso de vectores tipo octopina y 25 bp en el caso de vectores tipo nopalina. Las secuencias de núcleo en la región de límite derecho y la región de límite izquierdo forman repeticiones imperfectas. Las secuencias de núcleo de límite son indispensables para el reconocimiento y procesamiento mediante el complejo de corte *Agrobacterium* que consiste de por lo menos VirD1 y VirD2. Las secuencias de núcleo que flanquean un T-ADN son suficientes para promover la transferencia del T-ADN

25 Como se utiliza aquí, el término "vector de transformación de T-ADN" o "vector de T-ADN" incluye cualquier vector que abarca una secuencia de T-ADN flanqueada por un límite de T-ADN derecho e izquierdo que consiste de por lo menos las secuencias de núcleo de límite derecho e izquierdo, respectivamente, y se utilizan para la transformación de cualquier células eucariótica.

30 Como se utiliza aquí, el término "secuencia de estructura de vector de T-ADN" o "secuencias de estructura de vector de T-ADN" incluyen todos los ADN de un T-ADN que contiene el vector que se encuentra fuera de los límites de T-ADN y, más específicamente, fuera de los sitios de corte de las repeticiones imperfectas del núcleo de límite.

35 La presente especificación también describe vectores de T-ADN optimizados de tal manera que se minimiza o está ausente la integración de estructura del vector en el genoma de una célula eucariótica. El término "vector de T-ADN optimizado" como se utiliza aquí incluye un vector de TADN diseñado para reducir o abolir la transferencia de las secuencias de estructura de vector para el genoma de una célula eucariótica. Tales vectores de T-ADN se conocen por un experto en la técnica e incluyen aquellos descritos por Hanson et al. (1999) *Plant J.* 19:727-734, por Stuver et al. (1999-WO9901563) y por Depicker et al. (2001 - WO0144482).

40 La presente especificación describe la inclusión de una secuencia de ADN que codifica un ICK, homólogo, análogo, derivado o su fragmento inmunológicamente activo como se define supra, en cualquier vector de T-ADN que comprende los vectores de transformación binarios, los vectores de transformación super-binarios, los vectores de transformación cointegrados, los vectores de transformación derivados de Ri así como también en los vectores que llevan T-ADN utilizados en la transformación agrolística.

45 Como se utiliza aquí, el término "vector de transformación binario" incluye un vector de transformación de T-ADN que comprende: una región de T-ADN que comprende por lo menos un gen de interés y/o por lo menos un marcador seleccionable activo en la célula eucariótica a ser transformada; y una región de estructura de vector que comprende por lo menos los orígenes de replicación activa en *E. coli* y *Agrobacterium* y marcadores para selección en *E. coli* y *Agrobacterium*.

50 Los límites de T-ADN mediante un vector de transformación binario se pueden derivar de plásmidos Ti tipo nopalina o tipo octopina o de ambos. El T-ADN de un vector binario solo se transfiere en una célula eucariótica en conjunto con un plásmido auxiliar. Como se utiliza aquí, el término "plásmido auxiliar" incluye un plásmido que se mantiene establemente en *Agrobacterium* y por lo menos lleva a cabo el conjunto de genes vir necesarios para permitir la transferencia del T-ADN. El conjunto de genes vir se pueden derivar de plásmidos Ti tipo octopina o tipo nopalina o de ambos.



Como se utiliza aquí, el término "vector de transformación super-binario" incluye un vector de transformación binario que lleva adicionalmente en la región de estructura de vector una región vir del plásmido Ti pTiBo542 de la cepa *A. tumefaciens* súper virulenta A281 (EP0604662, EP0687730). Se utilizan los vectores de transformación súper binarios en conjunto con un plásmido auxiliar.

- 5 Como se utiliza aquí, el término "vector de transformación cointegrado" incluye un vector de T-ADN por lo menos que comprende: una región de T-ADN que comprende por lo menos un gen de interés y/o por lo menos un marcador seleccionable activo en plantas; y una región de estructura de vector que comprende por lo menos orígenes de replicación activa en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium*, y un conjunto de genes vir necesarios para permitir la transferencia del T-ADN. Los límites de TDNA y el conjunto de genes vir del vector T-ADN se pueden derivar de los plásmidos Ti tipo octopina o tipo nopalina o de ambos.

El término "vector de transformación de plantas derivado de Ri" incluye un vector de transformación binario en el que se derivan los límites de T-ADN de un plásmido Ti y el vector de transformación binario se utiliza en conjunto con un plásmido Ri 'auxiliar' que lleva el conjunto necesario de genes vir.

- 15 Los términos "agrolísticos", "transformación agrolística" o "transferencia agrolística" incluyen un método de transformación que combina características de la transformación mediada por *Agrobacterium* y del suministro de ADN biolístico. Como tal, un T-ADN que contiene el plásmido objetivo se cosumministra con ADN/ARN que permite planta la producción de VirD1 y VirD2 con o sin VirE2 (Hansen and Chilton (1996) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 93:14978-14983; Hansen et al. (1997) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 94:11726-11730; Hansen and Chilton (1997) - WO9712046).

- 20 Una célula anfitriona como se describe aquí, tal como una célula anfitriona eucariótica o procariótica en el cultivo, se puede utilizar para producir (es decir, expresar) una proteína ICK. De acuerdo con lo anterior, la especificación describe métodos para producir una proteína ICK utilizando las células anfitrionas de la invención. El método comprende cultivar la célula anfitriona como se describe aquí (dentro del cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica una proteína ICK) en un medio adecuado de tal manera que se produce una proteína ICK. El método comprende adicionalmente aislar una proteína ICK del medio o de la célula anfitriona.

- 25 Las células anfitrionas como se describe aquí también se pueden utilizar para producir la planta transgénica o los animales transgénicos no humanos en los que las secuencias exógenas ICK se han introducido en su genoma o plantas o animales recombinantes homólogos en los cuales se han alterado las secuencias endógenas ICK. Tales plantas y animales son útiles para estudiar la función y/o actividad de un ICK y para identificar y/o evaluar los moduladores de la actividad de ICK.

#### Plantas Transgénicas

- 35 Como se utiliza aquí, "planta transgénica" incluye una planta que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo. De manera general, el polinucleótido heterólogo se integra establemente dentro del genoma de tal manera que el polinucleótido se pasa en generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo se puede integrar dentro del genoma solo o como parte de un casete de expresión recombinante. "Transgénico" se utiliza aquí para incluir cualquier célula, estirpe celular, callo, tejido, parte de planta o planta, el genotipo del cual se ha alterado mediante la presencia del ácido nucleico heterólogo que incluye aquellos transgénicos inicialmente así alterados así como también aquellos creados por los cruces sexuales como la propagación asexual del transgénico inicial. El término "transgénico" como se utiliza aquí no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante métodos de siembra de planta convencionales o mediante el evento ocuriente tal como fertilización cruzada aleatoria, infección vírica no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante, o mutación espontánea.

- 45 Una planta transgénica como se describe aquí se puede crear al introducir un ácido nucleico que codifica el ICK dentro de la planta al colocarlo bajo el control de los elementos reguladores que aseguran la expresión en las células de planta. Estos elementos reguladores pueden ser heterólogos u homólogos con respecto a la molécula de ácido nucleico a ser bien expresada con respecto a las especies de planta a ser transformadas. En general, tales elementos reguladores comprenden un promotor activo en células de planta. Estos promotores se pueden utilizar para modular (por ejemplo incrementar o reducir) el contenido y/o composición de ICK en un tejido deseado. Para obtener la expresión en todos los tejidos de una planta transgénica, preferiblemente se utilizan promotores constitutivos, tal como el promotor 35 S de CaMV (Odell, Nature 313 (1985), 810-812) o promotores de tales genes como actina de arroz (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171) histona H3 de maíz H3 (Lepetit et al. (1992) Mol. Gen. Genet 231:276-285) o promotores de los genes poliubiquitina de maíz (Christensen, Plant Mol. Biol. 18 (1982), 675-689). Con el fin de alcanzar la expresión en tejidos específicos de una planta transgénica es posible utilizar los promotores específicos de tejido (ver, por ejemplo, Stockhaus, EMBO J. 8 (1989), 2245-2251 o Tabla 5, adelante).

Tabla 5:

I: PROMOTORES ESPECÍFICOS DE ÓRGANO, ESPECÍFICOS DE TEJIDO Y ESPECÍFICOS DE CÉLULA		
FUENTE DE GEN	PATRÓN DE EXPRESIÓN	REFERENCIA
$\alpha$ -amilasa (Amy32b)	aleurona	Lanahan et al, Plant Cell 4:203-211, 1992; Skriver et al, Proc Natl Acad Sci USA 88:7266-7270. 1991
Gen similar a catepsina $\beta$	aleurona	Cejudo et al, Plant Mol Biol 20: 849-856, 1992
Agrobacterium rhizogenes rolB	cámbium	Nilsson et al, Physiol Plant 100: 456-462, 1997
AtPRP4	Flores	<a href="http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html">http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html</a>
Sintasa chalcon (chsA)	Flores	Van der Meer et al, Plant Mol Biol 15: 95-109, 1990
LAT52	Antera	Twel et al, Mol Gen Genet 217: 240-245, 1989
apetala-3	Flores	
chitinasa	frutos (cerezas, uvas, etc)	Thomas et al. CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; <a href="http://winetitles.com.au/gwrdc/csh95-1.html">http://winetitles.com.au/gwrdc/csh95-1.html</a> )
rbcS-3A	Tejido verde (hoja eg)	Lam et al, Plant Cell 2:857-888, 1990; Tucker et al., Plant Physiol 113: 1303-1308, 1992
Genes específicos de hoja	Hoja	Baszczynski et al, Nucl Acid Res 16: 4732, 1988
AtPRP4	Hoja	<a href="http://salus.medium.edu/mmg/tieney/html">http://salus.medium.edu/mmg/tieney/html</a>
Promotor del gen adenina metiltransferasa del virus del cólera	Hoja	Mitra and Higgins, Plant Mol Biol 26: 85-93, 1994
Promotor de gen aidP del arroz	Hoja	Kagaya et al, Mol Gen Genet 248: 668-674, 1995
Promotor rbcS del arroz o tomate	Hoja	Kyozuka et al, Plant Physiol 102: 991-1000, 1993
Pino cab-6	Hoja	Yamamoto et al, Plant Cell Physiol 35: 773-778, 1994
Promotor rubisco	Hoja	
cab (clorofila a/b/proteína de unión)	Hoja	
Gen de guisante Blec4	Tejidos epidérmicos vegetativos y florales	Mandaci and Dobres, Plant Mol Biol 34:961-965
SAM22	hoja senescente	Crowell et al, Plant Mol Biol 18: 459-466, 1992

Gen ltp (gen de transferencia de lípido)		Fleming et al, Plant J 2:855-862, 1992
Gen R. japonicum nif	Nódulo	Patente estadounidense No 4 803165
Gen B. japonicum nifH	Nódulo	Patente estadounidense No 5008194
GmENOD40	Nódulo	Yang et al, Plant J 3:573-585, 1993
carboxilasa PEP (PEPC)	Nódulo	Pathirana et al, Plant Mol Biol 20: 437-450, 1992
Hemoglobina (Lb)	Nódulo	Gordon et al, J Exp Bot 44: 1453-1465, 1993
Gen del virus Tungro bacilliform	Floema	Bhattacharyya-Pakrasi et al, Plant J 4:71-79, 1992
Genes específicos de polen	Polen; microespora	Albani et al, Plant Mol Biol 15:605, 1990; Albani et al, Plant Mol Biol 16: 501, 1991
Zm13	Polen	Guerrero et al, Mol Gen Genet 224: 161-168, 1993
Gen apg	microespora	Twell et al, Sex Plant Reprod 6: 217-224, 1993
Gen específico de polen de maíz	Polen	Hamilton et al, Plant Mol Biol 18: 211-218, 1992
Gen que expresa el polen de girasol	Polen	Baltz et al, Plant J 2:713-721, 1992
Gen específico de polen B. napus	polen; antera; tapetum	Arnold et al, J Cell Biochem, Abstract No. Y101, 204, 1992
Genes expresables de raíz	Raíces	Tingey et al, EMBO J 6:1, 1987
Gen inducible a auxina de tabaco	Extremidad de raíz	Van der Zaal et al, Plant Mol Biol 16: 983, 1991
$\beta$ -tubulina	Raíz	Oppenheimer et al, Gene 63:87, 1988
Genes específicos de raíz de tabaco	Raíz	Conkling et al, Plant Physiol 93:1203, 1990
Gen B. napus G1-3b	Raíz	Patente estadounidense No 5401836
SbPRP1	Raíces	Suzuki et al, Plant Mol Biol 21: 109-119, 1993
AtPRP1; AtPRP3	raíces; pelos de raíz	<a href="http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html">http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html</a>
Gen RD2	Córtice de raíz	<a href="http://www2.cnsu.edu/ncsu/research">http://www2.cnsu.edu/ncsu/research</a>
Gen TobRB7	Vasculatura de raíz	<a href="http://www2.cnsu.edu/ncsu/research">http://www2.cnsu.edu/ncsu/research</a>
AtPRP4	hojas; flores; primordios de raíz lateral	<a href="http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html">http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html</a>
Genes específicos de semilla	Semilla	Simon et al, Plant Mol Biol 5:191, 1985; Scofield et al, J Biol Chem 262: 12202, 1987; Baszczynski et al, Plant Mol Biol 14:633, 1990

Albúmina Brazil Nut	Semilla	Pearson et al, Plant Mol Biol 18: 235-245, 1992
Legumbre	Semilla	Ellis et al, Plant Mol Biol 10:203-214, 1988
glutelina (arroz)	Semilla	Takaiwa et al, Mol Gen Genet 208: 15-22, 1986; Takaiwa et al, FEBS Lett 221:43-47, 1987
Zeína	Semilla	Matzke et al, Plant Mol Biol 14:323-32 1990
napA	Semilla	Stalberg et al, Planta 199:515-519, 1996
trigo LMW y HMW glutenina-1	endospermo	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; Nucl Acids Res 17:461-462, 1989
trigo SPA	Semilla	Albani et al, Plant Cell 9:171-184, 1997
cZ19B1, 19 kDa de zeína de maíz	Semilla	WO0011177
mi1ps, mioinositol de maíz-1-sintasa Pi	Semilla	WO0011177
trigo $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -gliadinas	endospermo	EMBO J 3:1409-1415, 1984
Promotor de cebada ltr1	Endospermo	
cebada B1, C, D, hordeína	Endosperma	Theor Appl Gen 98:1253-1262, 1999; Plant J 4:343- 355, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
cebada DOF	Endosperma	Mena et al, Plant J 116:53-62, 1998
blz2	Endosperma	EP99106056.7
Promotor sintético	Endosperma	Vicente-Carbajosa et al, Plant J 13: 629-640, 1998
prolamina NRP33 de arroz	endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiol 39: 885-889, 1998
$\alpha$ -globulin Glb-1 de arroz	endospermo	Wu et al, Plant Cell Physiol 39: 885-889, 1998
Genes de maíz END	endospermo	WO0012733
cebada END1	endospermo	WO9808961
cebada NUC1	Núcleo	WO9808961
OSH1 de arroz	embrión	Sato et al, Proc Natl Acad Sci USA 93:8117-8122, 1996
$\alpha$ -globulina REB/OHP-1 de arroz	endospermo	Nakase et al, Plant Mol Biol 33: 513-522, 1997
ADP-glucosa PP de arroz	endospermo	Trans Res 6:157-168, 1997
familia del gen de maíz ESR	endospermo	Plant J 12:235-246, 1997
$\gamma$ -kafirina de sorgo	endospermo	Plant Mol Biol 32:1029-1035, 1996
KNOX	embrión	Postma-Haarsma et al, Plant Mol Biol 39:257-271, 1999

Oleosina de arroz	embrión y aleurón	Wu et al, J Biochem 123:386, 1998
oleosina de girasol	Semilla (embrión y semilla seca)	Cummins et al, Plant Mol Biol 19: 873-876, 1992
LEAFY	meristema de raíz	Weigel et al, Cell 69:843-859, 1992
Arabidopsis thaliana knat1	meristema de raíz	Número de acceso AJ131822
Malus domestica kn1	meristema de raíz	Número de acceso Z71981
CLAVATA1	meristema de raíz	Número de acceso AF049870
Genes específicos de estigma	Estigma	Nasrallah et al, Proc Natl Acad Sci USA 85:5551, 1988; Trick et al, Plant Mol Biol 15:203, 1990
Gen patatin clase I	tubérculo	Liu et al, Plant Mol Biol 153:386-395, 1991
PCNA de arroz	meristema	Kosugi et al, Nucl Acids Res 19: 1571-1576, 1991; Kosugi y Ohashi, Plant Cell 9:1607-1619, 1997
Tubulina TubA1 de guisante	Células divisorias	Stotz and Long, Plant Mol Biol 41: 601-614, 1999
Arabidopsis cdc2a	Células ciclizantes	Chung and Parish, FEBS Lett 362: 215-219, 1995
Arabidopsis Rop1A	Anteras; polen maduro + tubos de polen	Li et al, Plant Physiol 118:407-417, 1998
Arabidopsis AtDMC1	Meiosis asociada	Klimyuk and Jones, Plant J 11:1-14, 1997
PS-IAA4/5 y PS-IAA6 de guisantes	inducible por Auxina	Wong et al, Plant J 9:587-599, 1996
Farnesiltransferasa de guisante	Tejidos meristemáticos; tejidos de crecimiento cercanos a floema; reprimidos a la azúcar y la luz	Zhou et al, Plant J 12:921-930,1997
Tabaco (N. sylvestris) ciclina B1;1	Células divisorias / tejido meristemático	Trehin et al, Plant Mol.Biol. 35: 667-672, 1997
Ciclinas mitóticas CYS Catharanasí roseus (tipo A) y CYM (tipo B)	Células divisorias / tejido meristemático	Ito et al, Plant J 11:983-992, 1997
Arabidopsis cyc1At (=cyc B1;1) y cyc3aAt (tipo A)	Células divisorias / tejido meristemático	Shaul et al, Proc Natl Acad Sci USA 93:4868-4872, 1996
Cuadro promotor Arabidopsis tef1	Células divisorias / tejido meristemático	Regad et al, Mol Gen Genet 248: 703-711, 1995
Catharanasí roseus cyc07	Células divisorias / tejido meristemático	Ito et al, Plant Mol Biol 24:863-878, 1994
II: PROMOTORES CONSTITUTIVOS		
Actina		

CAMV 35S	constitutivo constitutivo	McElroy et al, Plant Cell 2:163-171, 1990 Odell et al, Nature 313:810-812, 1985
CaMV 19S	constitutivo	Nilsson et al, Physiol Plant 100: 456-462, 1997
GOS2	constitutivo	de Pater et al, Plant J 2:837-844, 1992
ubiquitina	constitutivo	Christensen et al, Plant Mol Biol 18: 675-689, 1992
Ciclofilina de arroz	constitutivo	Buchholz et al, Plant Mol Biol 25: 837-843, 1994
Histona de maíz H3	constitutivo	Lepetit et al, Mol Gen Genet 231: 276-285, 1992
histona H3 de alfalfa	constitutivo	Wu et al, Nucleic Acids Res 17: 3057-3063, 1989; Wu et al, Plant Mol Biol 11:641-649, 1988
actina 2	constitutivo	An et al, Plant J 10:107-121, 1996
III: PROMOTORES INDUCIBLES POR TENSIÓN		
P5CS (sintasa delta(1)-pirrolina-5- carboxilato)	sal, agua	Zhang et al, Plant Sci 129:81-89, 1997
cor15a	Frío	Hajela et al, Plant Physiol 93: 1246-1252, 1990
cor15b	Frío	Wihelm et al; Plant Mol Biol 23: 1073-1077, 1993
cor15a (-305 a +78 nt)	frío, sequía	Baker et al, Plant Mol Biol 24: 01-713, 1994
rd29	sal, sequía, frío	Kasuga et al, Nature Biotechnol 18: 287-291, 1999
Proteínas de choque de calor, que incluyen promotores artificiales que contienen el elemento de choque de calor (HSE)	Calor	Barros et al, Plant Mol Biol 19 665-75, 1992. Marrs et al, Dev Genet14: 27-41, 1993. Schoffl et al, Mol Gen Genet 217:246-53, 1989.
smHSP (proteínas de choque de calor pequeñas)	Calor	Waters et al, J Exp Bot 47:325-338, 1996
wcs120	Frío	Ouellete et al, FEBS Lett 423: 324-328, 1998
ci7	Frío	Kirch et al, Plant Mol Biol 33:897-909, 1997
Adh	Frío, sequía, hipoxia	Dolferus et al, Plant Physiol 105: 1075-87, 1994
pws18	agua: sal y sequía	Joshee et al, Plant Cell Physiol 39: 64-72, 1998
ci21A	Frío	Schneider et al, Plant Physiol 113: 335-45, 1997
Trg-31	Sequía	Chaudhary et al, Plant Mol Biol 30: 1247-57, 1996
Osmotina	osmótico	Raghothama et al, Plant Mol Biol 23: 1117-28, 1993
LapA	Formación de heridas, ambiente	WO99/0397 Universidad de California/ INRA
IV: PROMOTORES INDUCIBLES POR PATÓGENO		

RB7	nemátodos de la raíz (Meloidogyne spp.)	US5760386 – Universidad del Estado de Carolina del Norte; Opperman et al, Science 263:221-23, 1994
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	Hongos, virus, bacterias	Ward et al, Plant Cell 3:1085-1094, 1991; Reiss et al 1996; Lebel et al, Plant J 16:223-233, 1998; Melchers et al, Plant J 5:469-480, 1994; Lawton et al, Plant Mol Biol, 19:735-743, 1992
HMG2	nemátodos	WO9503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc.
Abi3	Cyst nemátodos (Heterodera spp.)	No publicado
ARM1	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9:2119-2134, 1997 WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9: 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Att1712	nemátodos	Barthels et al, Plant Cell 9, 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Gst1	Diferentes tipos de patógenos	Strittmatter et al, Mol Plant-Microbe Interactuar 9:68-73, 1996
LEMMI	nemátodos	WO 92/21757- Plant Genetic Systems
CLE	geminivirus PCT/EP99/03445 - CINESTAV	
PDF1.2	Hongos que incluyen Alternaria brassicicola y Botrytis cinerea	Manners et al, Plant Mol Biol, 38: 1071-1080, 1998
Thi2.1	Hongos - Fusarium oxisporum f sp. mattirolae	Vignutelli et al, Plant J 14:285-295, 1998
DB#226	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interactuar 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Dub#280	nemátodos	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interactuar 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Cat2	nemátodos	Niebel et al, Mol Plant-Microbe Interactuar 8:371-378, 1995
KTub	nemátodos	Aristizabal et al (1996), 8th International Congress on Plant- Microbe Interaction, Knoxville US B- 29
sHSP	nemátodos	Fenoll et al (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler y SA. Ohl (Eds.),
Tsw12	nemátodos	Fenoll et al (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler y S.A. Ohl (Eds.)
Hs1(pro1)	nemátodos	WO 98/122335 - Jung

nsLTP	virus, hongos, bacterias	Molina and Garcia-Olmedo FEBS Lett. 316:119-122, 1993
RIP	virus, hongos	Turner et al, Proc Natl Acad Sci USA 94:3866-3871, 1997

5 Los promotores listados en la tabla anterior se proporcionan para los ejemplos de solo ejemplificación y la materia objeto descrita en esta especificación que no se limita por la lista proporcionada aquí. Aquellos expertos en la técnica estará fácilmente en una posición para proporcionar promotores adicionales que son útiles en desarrollar la materia objeto descrita en esta especificación. Los promotores listados también se pueden modificar para proporcionar especificidad de la expresión según se requiera.

10 También se conocen promotores que son específicamente activos en tubérculos de papa o en semillas de diferentes especies de planta, tal como maíz, Vicia, trigo, cebada y similares. Los promotores inducibles se pueden utilizar con el fin de ser capaces de expresión de control exacta bajo ciertas condiciones ambientales o desarrolladas tal como patógenos, anaerobia, o luz. Ejemplos de los promotores inducibles incluyen los promotores de genes que codifican las proteínas de choque de calor o elementos reguladores específicos de microespora (WO96/16182). Adicionalmente, se puede emplear el sistema Tet inducible químicamente (Gatz, Mol. Gen. Genet. 227 (1991); 229-237). Los promotores adecuados adicionales son conocidos y se describen por las personas expertas en la técnica y, por ejemplo, en Ward (Plant Mol. Biol. 22 (1993), 361-366). Los elementos reguladores pueden comprender adicionalmente mejoradores transcripcionales y/o mejoradores traduccionales funcionales en células de plantas. Adicionalmente, los elementos reguladores pueden incluir señales de terminación de la transcripción, tal como una señal poli-A, que conduce a la adición de una cola poli A para el transcripto que puede mejorar su estabilidad.

20 En el caso que una molécula de ácido nucleico como se describe aquí se exprese en una orientación codificante, la secuencia codificante se puede modificar de tal manera que la proteína se ubica en cualquier compartimento deseado de la célula de planta, por ejemplo, el núcleo, retículo endoplasmático, el vacuolo, la mitocondria, los plástidos, el apoplasto, o el citoplasma.

25 Los métodos para la introducción de ADN extraño en plantas también son bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la transformación de células de planta o tejidos con T-ADN utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, la fusión de protoplastos, transferencia de gen directa (ver, por ejemplo, EP-A 164 575), inyección, electroporación, métodos biolísticos como bombardeo de partícula, transformación mediada por polen, transformación mediada por virus de ARN de planta, transformación mediada por liposoma, transformación utilizando embriones inmaduros que degradan la enzima o formación de heridas, o callo embriogénico degradado por enzima o formación de heridas y otros métodos conocidos en la técnica. Los vectores utilizados en el método de la invención pueden contener elementos funcionales adicionales, por ejemplo secuencias de "límite izquierdo"- y "límite derecho"-del T-ADN de *Agrobacterium* que permite la integración estable dentro del genoma de la planta. Adicionalmente, se conocen métodos y vectores por la persona experta en la técnica que permite la generación de plantas transgénicas libres de marcador, es decir, el gen marcador seleccionable o clasificable se pierde en una cierta etapa de desarrollo de planta o siembra de planta. Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, cotransformación (Lyznik, Plant Mol. Biol. 13 (1989), 151-161; Peng, Plant Mol. Biol. 27 (1995), 91-104) y/o al utilizar sistemas que utilizan enzimas capaces de promover la recombinación homóloga en plantas (ver, por ejemplo, WO97/08331; Bayley, Plant Mol. Biol. 18 (1992), 353-361; Lloyd, Mol. Gen. Genet. 242 (1994), 653-657; Maeser, Mol. Gen. Genet. 230 (1991), 170-176; Onouchi, Nucl. Acids Res. 19 (1991), 6373-6378). Los métodos para la preparación de vectores apropiados se describen por, por ejemplo, Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2da Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

40 Las cepas adecuadas de *Agrobacterium tumefaciens* y los vectores, así como también la transformación de *Agrobacterias*, y medios de selección y crecimiento apropiados se describen en, por ejemplo, GV3101 (pMK90RK), Koncz, Mol. Gen. Genet. 204 (1986), 383-396; C58C1 (pGV 3850kan), Deblaere, Nucl. Acid Res. 13 (1985), 4777; Bevan, Nucleic. Acid Res. 12 (1984), 8711; Koncz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 8467-8471; Koncz, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 963-976; Koncz, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: Plant Molecular Biology Manual Vol 2, Gelvin and Schilperoort (Eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; EP-A-120 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Chapter V, Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46; An, EMBO J. 4 (1985), 277-287). Aunque se prefiere el uso de *Agrobacterium tumefaciens* en el método de la invención, se pueden utilizar, otras cepas de *Agrobacterium*, tal como *Agrobacterium rhizogenes*, por ejemplo, si se desea un fenotipo que se confiere mediante dicha sepa.

50 Los métodos para la transformación utilizando métodos biolísticos se conocen por la persona experta en la técnica; ver, por ejemplo, Wan, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil, Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558 y Christou



(1996) Trends in Plant Science 1,423-431. La microinyección se puede desarrollar como se describe en Potrykus and Spangenberg (eds.), Gene Transfer To Plants. Springer Verlag, Berlin, NY (1995).

5 Se puede desarrollar la mayoría de plantas dicotiledóneas utilizando los métodos descritos anteriormente o utilizando la transformación por medio de métodos biolísticos como, por ejemplo, se describió anteriormente así como también transformación de protoplasto, electroporación de células parcialmente permeabilizada, o la introducción de ADN utilizando fibras de vidrio.

10 En general, las plantas que se modifican como se describe aquí se pueden derivar de cualquier especie de planta deseada. Ellas pueden ser plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas, preferiblemente ellas pertenecen a las especies de planta de interés en la agricultura, cultivo de madera o de interés horticultural, tal como plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, arroz, cebada, trigo, centeno, avena), papa, plantas que producen aceite (por ejemplo, colza, girasol, guisante, soya), algodón, remolacha, caña de azúcar, plantas leguminosas (por ejemplo, habichuelas, guisantes), o plantas que producen madera, preferiblemente árboles.

15 La presente especificación también describe una planta de célula transgénica que contiene (preferiblemente establemente integrado dentro de su genoma) una molécula de ácido nucleico como se describe aquí ligada a elementos reguladores que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico en células de planta. La presencia y la expresión de la molécula de ácido nucleico en las células de planta transgénica conduce a la síntesis de una proteína ICK y puede conducir a cambios fisiológicos y fenotípicos en plantas que contienen tales células.

20 Las células de planta transformadas que se derivan por cualquiera de las técnicas de transformación anteriores se pueden cultivar para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado. Tales técnicas de regeneración frecuentemente dependen de la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejido, típicamente dependen de un biocida y/o marcador herbicida que se ha introducido con un polinucleótido de la presente invención.

25 Las células de planta transformadas con un vector de expresión de planta se puede regenerar, por ejemplo, a partir de células únicas, tejido de callo o discos de hoja de acuerdo con técnicas de cultivo de tejido de planta estándar. Es bien conocido en la técnica que varias células, tejidos, y órganos de casi cualquier planta se pueden cultivar exitosamente para regenerar una planta completa. La regeneración de la planta de protoplastos cultivados se describe en Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing Company, New York, pp. 124-176 (1983); y Binding Regeneration de Plants, Plant Protoplasts, CRC Press, Boca Raton, pp. 21-73 (1985).

30 Se pueden cultivar células de planta transformadas, callos o explantes en el medio de regeneración en la oscuridad de varias semanas, de manera general aproximadamente 1 a 3 semanas para permitir madurar a los embriones somáticos. Los medios de regeneración preferidos incluyen medios que contienen sales MS, tal como los medios PHI-E y PHI-F. Luego se pueden cultivar típicamente células de plantas, callos o explantes en medio de enraizamiento en un ciclo de luz/oscuridad hasta que se desarrollen brotes y raíces. Se conocen los métodos para la regeneración de plantas en la técnica y se proporcionan métodos preferidos por Kamo et al., (Bot. Gaz. 146(3):324-334, 1985), West et al., (Plant Cell 5: 1361-1369. 1993), y Duncan et al. (Plant 165:322-332, 1985).

35 Las plántulas pequeñas luego se pueden transferir a los tubos que contienen medio de enraizamiento y se les permite crecer y desarrollar más raíces durante aproximadamente otra semana. Las plantas luego se pueden transplantar a mezcla de suelo manchado en el invernadero.

40 La regeneración de las plantas que contiene el gen extraño introducido por Agrobacterium de explantes de hoja se puede lograr como se describe por Horsch et al., Science, 227:1229-1231 (1985). En este procedimiento, los transformantes se hacen crecer en la presencia de un agente de selección y en un medio que induce la regeneración de brote en las especies de planta que se transforman como se describe por Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 80:4803 (1983). Este procedimiento produce típicamente produce brotes dentro de dos a cuatro semanas y estos brotes transformados luego se transfieren a un medio que induce raíz apropiado que contiene el agente selectivo y un antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano. Las plantas transgénicas como se describe aquí pueden ser fértiles o estériles.

45 La regeneración también se puede obtener de callos de planta, explantes, órganos, o sus partes. Tales técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee et al., Ann. Rev. of Plant Phys., 38:467-486(1987). La regeneración de plantas de protoplastos de única planta o varios explantes es bien conocida en la técnica. Ver, ejemplo, Methods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach and H. Weissback, eds., Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1988). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye las etapas de selección de células transformadas y brotes, enraizamiento de los brotes transformantes y crecimiento de las plántulas en el suelo. Para el cultivo celular de maíz y la regeneración ver generalmente, The maize Handbook, Freeling and Walbot, Eds.,

Springer, New York (1994); Corn and Corn Mejoramiento, 3ra edición, Sprague and Dudley Eds., American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1988).

5 Un experto reconocerá que después que el casete de expresión recombinante se incorpore establemente en las plantas transgénicas y confirme ser operable, este se puede introducir dentro de las otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se pueden utilizar cualquiera de un número de técnicas de siembra estándar, dependiendo de las especies a ser cruzadas.

10 En los cultivos propagados vegetativamente, las plantas transgénicas maduras se pueden propagar al tomar cortes o mediante las técnicas de cultivo de tejido para producir múltiples plantas idénticas. La selección de transgénicos deseables se hace y se obtienen nuevas variedades y se propagan vegetativamente para uso comercial. En cultivos propagados de semilla, las plantas transgénicas maduras se pueden autocruzar para producir una planta homocigota congénita. La planta congénita produce semillas que contienen el ácido nucleico heterólogo nuevamente introducido. Estas semillas se pueden hacer crecer para producir plantas que producirían el fenotipo seleccionado, (por ejemplo, contenido del ciclo celular alterado o composición).

15 Las partes obtenidas de la planta regenerada, tal como flores, semillas, hojas, ramas, frutos y similares también se describen aquí dado que estas partes comprenden células que comprenden el ácido nucleico aislado de la presente invención. La progenie y variantes, y mutantes de las plantas regeneradas también se describen aquí, dado que estas partes comprenden las secuencias de ácido nucleico introducidas.

20 Las plantas transgénicas que expresan el marcador seleccionable se pueden detectar para la transmisión del ácido nucleico como se describe aquí mediante, por ejemplo, inmunotransferencia estándar y técnicas de detección de ADN. Las líneas transgénicas también se evalúan típicamente en los niveles de la expresión del ácido nucleico heterólogo. La expresión del nivel de ARN se puede determinar inicialmente para identificar y cuantificar las plantas positivas para expresión. Las técnicas estándar para análisis de ARN se pueden emplear e incluyen ensayos de amplificación de PCR utilizando cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar solo las plantillas de ARN heterólogas y los ensayos de hibridación de solución ensayos utilizando las sondas específicas de ácido nucleico heterólogas. Las plantas positivas de ARN luego se pueden analizar para la expresión de la proteína mediante análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos específicamente reactivos como se describe aquí.

30 Adicionalmente, la hibridación e inmunocitoquímica in situ de acuerdo con los protocolos estándar se puede hacer utilizando sondas de polinucleótido específicas de ácido nucleico heterólogas y anticuerpos, respectivamente, para localizar sitios de la expresión dentro del tejido transgénico. De manera general, se detectan usualmente un número de líneas transgénicas para el ácido nucleico incorporado para identificar y seleccionar plantas con los perfiles de expresión más apropiados.

35 Una realización preferida como se describe aquí es una planta transgénica que es homocigota para el ácido nucleico heterólogo agregado es decir, una planta transgénica que contiene dos secuencias de ácido nucleico agregado, un gen en el mismo locus de cada cromosoma de un par de cromosomas. Una planta transgénica homocigota se puede obtener mediante apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica heterocigota que contiene un único ácido nucleico heterólogo agregado, germinando alguna de las semillas producidas y analizando las plantas resultantes producidas para la división celular alterada con relación a una planta de control (es decir, nativo, no transgénico). El retrocruzamiento de una planta progenitora y exogamia con una planta no transgénica también se contemplan.

40 La presente especificación también describe plantas transgénicas y tejidos de planta que comprende células de planta transgénica como se describe aquí. Debido a la (sobre) expresión de una molécula ICK, por ejemplo, en las etapas de desarrollo y/o en tejidos de plantas en los que ellos no ocurren naturalmente, estas plantas transgénicas pueden mostrar varias modificaciones fisiológicas, desarrolladas y/o morfológicas en comparación con las plantas tipo natural.

45 Por lo tanto, también se describe aquí el uso de las moléculas ICK para modular el ciclo celular y/o la división celular de plantas y/o crecimiento en células de planta, tejidos de planta, órganos de plantas y/o plantas completas. La especificación también describe un método para influenciar las proteínas de control de la actividad del ciclo celular tal como CDK y ciclinas en una célula de planta al transformar la célula de planta con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o la manipulación de la expresión de la molécula.

50 La especificación también describe una célula de planta transgénica que contiene (preferiblemente establemente integrado dentro su genoma) una molécula de ácido nucleico como se describe aquí o parte de la misma, en donde la transcripción y/o la expresión de la molécula de ácido nucleico o parte de la misma conduce a la reducción de la síntesis de un ICK. En una realización preferida, la reducción se logra mediante un efecto mutante anticodificante, codificante, ribozima, cosupresión y/o dominante. La reducción de la síntesis de una proteína como se describe aquí en las células de planta transgénica pueden resultar en una alteración en, por ejemplo, la división celular. En las

plantas transgénicas que comprenden tales células puede conducir a varios cambios fisiológicos, desarrollados y/o morfológicos.

- 5 La especificación también describe partes cosechables y la propagación del material de las plantas transgénicas como se describe aquí que contienen células de planta transgénicas que expresan una molécula de ácido nucleico como se describe aquí o que contienen células que muestran un nivel reducido de la proteína descrita. Las partes cosechables pueden ser en principio cualesquier partes útiles de una planta, por ejemplo, flores, polen, semillas, tubérculos, hojas, tallos, frutos, semillas, raíces etc. El material de propagación incluye, por ejemplo, semillas, frutos, recortes, semillas, tubérculos, raíces, y similares.

#### VI. Composiciones Agrícolas

- 10 Las moléculas ICK de ácido nucleico, proteínas ICK, y anticuerpos anti-ICK (también denominado aquí como "compuestos activos") como se describe aquí se pueden incorporar dentro de las composiciones útiles en la agricultura y en las células de planta y cultivo de tejido. Las composiciones de protección de planta se pueden preparar mediante medios convencionales comúnmente utilizados para la aplicación de, por ejemplo, herbicidas y pesticidas. Por ejemplo, ciertos aditivos conocidos por aquellos expertos en la técnica se puede utilizar estabilizantes o sustancias que facilitan la retoma mediante las células de planta, tejidos de planta o plantas.
- 15

Las composiciones agrícolas se pueden incluir en un recipiente, empaque, o dispensador junto con instrucciones para administración.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no se debe construir como limitantes.

#### **EJEMPLOS**

- 20 A menos que se indica otra cosa en el ejemplo, se desarrollan todas las técnicas de ADN recombinante de acuerdo con los protocolos como se describe en Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY o en Ausubel et al. (1999) Current Protocols in Molecular Biology, CD-ROM, John Wiley & Sons, Inc, NY. El material y los métodos estándar para el trabajo molecular de la planta se describen en Plant Molecular Biology Labfase (1993) by R.D.D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications (UK).
- 25

#### **EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE LA COLECCIÓN DE cADN DE DOS HÍBRIDOS DE ARROZ**

- 30 Para la identificación de los ICK, se desarrolla un sistema de dos híbridos con base en la activación transcripcional Gal4 con la ayuda de identificar proteínas que interactúan en CDC2Os1. Se extrae ARN total de los cultivos de suspensión celular cosechados a 0, 3, 6, 9, y 12 días después de subcultivo en medio fresco. Estos puntos de tiempo que corresponden a las células en la fase de retraso luego de subcultivo, el crecimiento exponencial, y la fase estacionaria tardía. Luego se agrupan las cantidades equimolares de ARN total (5 x 100 µg) de las diferentes fracciones. Se utiliza la muestra de ARN total para purificar 5 µg de poliA+ mARN utilizando el equipo de aislamiento de mARN Poli(A) Quik (Stratagene), con base en las columnas de celulosa oligo(dT). La síntesis y subclonación del cADN dentro del vector lambda HybriZAP-2.1 se desarrollan de acuerdo con las directrices del proveedor (Stratagene). Se producen aproximadamente 2 millones de unidades formadoras de placa independientes, con un tamaño de inserto promedio de 1.0 kb. La amplificación de banco y corte de masa para obtener fagémidos utilizados para transformar la levadura se hacen siguiendo el mismo manual de instrucciones.
- 35

- 40 Se amplifica el gen de arroz Cdc2-Os1 utilizando los siguientes cebadores (codificante: 5'-AGGGATGTTTAATACCACTAC-3', SEQ ID NO:33 y cebador anticodificante: 5'-GCACAGTTGAAGTGAACCTTGC-3', SEQ ID NO:34) y la polimerasa de ADN Pfx (Promega). El fragmento de PCR es de extremo romo clonado dentro del sitio SmaI del vector de cebo pBD-Gal4 (Stratagene) en estructura con el dominio de unión. El vector de cebo se introduce en levadura PJ69-4a de acuerdo con el "Protocolo Rápido y Fácil TRAF0" (Gietz, R.D. y R.A. Woods, (1994) High Efficiency transformation in Yeast (Invited Book Chapter) In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134.) y los transformantes se seleccionan en medio marginado que carece de triptofan. Estos transformantes se confirman por PCR utilizando los cebadores mencionados anteriormente.
- 45

Utilizando el ensayo de dos híbridos de levadura, se identifica un número de clones que interactúan con Cdc2Os1. De forma sorprendente, sin embargo, ninguno de estas clones es un ICK.

- 50 La colección de cADN de dos híbridos lambdaHybriZAP-2.1 (Stratagene, La Jolla, CA) hecha del cultivo de suspensión de arroz como se bosquejo anteriormente se deposita en Octubre 27, 2000 con las 'colecciones coordinadas Belgicas de microorganismos' (BCCM-LMBP, University Gent, Laboratorium voor Moleculaire Biologie,

K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium) de acuerdo con las regulaciones del tratado de Budapest. El BCCM se reconoce por la WIPO como un IDA. El número de acceso del depósito es LMBP4268).

### EJEMPLO 2: CLONACIÓN MOLECULAR DE LOS FRAGMENTOS ICK

5 Para solucionar el problema mencionado anteriormente, las bases de datos de secuencia públicas (disponibles en, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.tigr.org>) se detectan para el motivo de aminoácido "GRYEW" ubicado en el terminal carboxilo de todos los ICK de planta conocidos, utilizando el programa BLAST avanzado con un alto valor esperado (1000).

10 Utilizando el método mínimo de base de datos anterior, se obtienen cuatro aciertos en *Oryza sativa*, un EST (cADN parcial, número de acceso GenBank AU075786, SEQ ID NO:1, denominado OsICK2), dos GSS (secuencias parciales genómicas, número de acceso GenBank AQ574895, SEQ ID NO:2, denominado OsICK1 y número de acceso GenBank AQ365042, SEQ ID NO:3, denominado OsICK3), y un HTGS (secuencias genómicas de alto rendimiento, número de acceso GenBank AC069145, SEQ ID NO:4, denominado OsICK4), ninguno de ellos anotados como que codifica una proteína putativa ICK. Cuatro clones no anotados adicionales, dos EST *Zea mays* (número de acceso GenBank AI737717, SEQ ID NO:5, denominado ZmICK1; y número de acceso GenBank AW267370, SEQ ID NO:6, denominado ZmICK2) un clon genómico BAC de Sorgo bicolor (número de acceso GenBank AF061282, SEQ ID NO:7, denominado SblCK), y un cADN de *Pinus taeda* (número de acceso GenBank AA556411, SEQ ID NO:8, denominado PtICK) se identifican como ICK de planta.

Los siguientes cebadores se diseñan para desarrollar un PCR para amplificar los fragmentos identificados:

OsICK1 que produce un fragmento de ADN 178 bp:

20 5'-TAACTCGATCCCCAGCCTCTCCCA-3' (SEQ ID NO:25) y

5'-TACAATTACGACATTGCCCTCGAC-3'(SEQ ID NO:26)

OsICK2 que produce un fragmento 430 bp:

5'-CCGCCGAGATCGAGGCGTTCTTCG-3' (SEQ ID NO:27) y

5'-AAACCTCTGATAAATACTGGGACG-3'(SEQ ID NO:28)

25 OsICK3 que produce un fragmento 200 bp:

5'-CTGTCACACACTCACACTCACACT -3' (SEQ ID NO:29) y

5'-CGAAGAACGCCTCGATCTCC-3'(SEQ ID NO:30)

OsICK4 que produce un fragmento 271 bp:

5'-GAATACCAGGGAGACGACACCTTGC-3'(SEQ ID NO:31)

30 5'-TCAGTCTAGCTTGACCCATTCAAAC-3'(SEQ ID NO:32)

El banco de dos híbridos (en la forma de plásmido) se utiliza para amplificar todos estos fragmentos, que luego se subclonan dentro del sitio pUC18 *Sma*I y se transforman en *E. coli* siguiendo las técnicas de biología molecular estándar.

### 35 EJEMPLO 3: HIBRIDACIÓN DE DETECCIÓN DE LA COLECCIÓN DE cADN DE DOS HÍBRIDOS DE ARROZ Y CLONACIÓN MOLECULAR DE cADN OsICK2 DE LONGITUD COMPLETA

Luego de la purificación de plásmido de *E. coli*, se aíslan los cuatro fragmentos mediante restricción y purificación de gel siguiendo las técnicas conocidas en el arte. Los fragmentos respectivos se marcan radioactivamente con la ayuda para identificar, por medio de hibridación homóloga, los cADN correspondientes en la colección de dos híbridos. Las diluciones seriales de una preparación de plásmido (6 µg/ µl) de la colección se utiliza como plantilla para amplificación PCR. Para el OsICK2, se puede amplificar 430 bp hasta dilución 10<sup>-4</sup>. Esta dilución se utiliza para transformar células ultracompetentes XL-10 Gold (Stratagene). Luego se detectan aproximadamente 70,000 colonias con el fragmento marcado OsICK2. Un número de colonias putativas positivas se vuelven a detectar por medio de PCR utilizando los cebadores de OsICK2. Un total de 5 clones positivos se obtienen finalmente, uno de los

cuales se caracteriza adicionalmente. el secuenciamiento del inserto indica que este clon es de hecho el clon OsICK2 de longitud completa.

**EJEMPLO 4: DETECCIÓN DE DOS HÍBRIDOS Y DETECCIÓN DE HIBRIDACIÓN DE LA COLECCIÓN DE cADN DE DOS HÍBRIDOS DE ARROZ Y CLONACIÓN MOLECULAR CLONAR DE cADN OSICK4 DE LONGITUD COMPLETA**

Como se describe en el Ejemplo 1, una primera detección de dos híbridos de la colección de cADN de dos híbridos de arroz utilizando Cdc2-Os 1 como cebo no produce cualesquier interactuadores OsICK como Cdc2-Os1. La detección de dos híbridos se repite en un intento secundario para obtener los clones OsICK por medio de esta metodología. En paralelo, la detección de hibridación de la colección de cADN de dos híbridos de arroz se desarrolla como se describe en el Ejemplo 3 con la ayuda de obtener un cADN OsICK4 de longitud completa.

Detección de dos híbridos

La detección de una colección preparada a partir de una suspensión celular de arroz dividida activamente se lleva a cabo mediante transformación secuencial de la levadura. Se transforma PJ69-4a que lleva pBD-cdc2Os-Gal4 con ADN de colección de acuerdo con el protocolo del Sistema de Dos Híbridos Matchmaker (protocolo#PT1020-1, version#PR4Y411) de CLONTECH Laboratories, Inc. Después de una transformación de escala de colección (eficiencia de clones 17268 / ADN µg) un número total de 672 clones se recuperan del medio selectivo (SD-TLH) que carece de triptofan, leucina y histidina. Estos clones se seleccionan adicionalmente en SD-TLA (que carece de triptofan, leucina y adenina) y SD-TLAH (que carece de triptofan, leucina, adenina y histidina). Se seleccionan finalmente nueve clones y se secuencian. Entre los nueve clones se identifica un inhibidor CDK que es una secuencia de cADN OsICK4 putativa parcial que pierde el extremo 5'.

Detección de hibridación

El fragmento OsICK4 clonado en pUC 18 como se describe en el Ejemplo 2 se utiliza para preparar una sonda para la detección de hibridación de la colección de cADN de dos híbridos de arroz. Los cebadores con la SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32 (ver Ejemplo 2) se utilizan para este propósito. Se detectan aproximadamente 750.000 unidades formadoras de placa de la colección de cADN de dos híbridos de suspensión celular. Las placas se transfieren a membranas Hybond N+ (Amersham). Los filtros obtenidos se prehibridan en fosfato de sodio al 0.25M, (pH7.2), SDS 7% a 60°C durante 4 horas. Se desarrolla hibridación con el amortiguador de prehibridación que contiene 50 ng de la sonda marcada [α]<sup>32</sup>P-dCTP- a 60 °C durante la noche (protocolo de Church G.M. y Gilbert W. PNAS USA 81:1991-1994). Los filtros se lavan dos veces con 1XSSC, 0.1%SDS a 60 °C durante 30 minutos y luego una vez con 0.1XSSC, 0.1%SDS a 60 °C durante 30 minutos. Las membranas se colocan en un casete de película y se exponen a la película durante 6 horas. Los cuatro clones se aíslan. Se desarrolla una segunda ronda de detección en estos clones. Se aíslan placas positivas puras de las cuales se cortan los fagémidos. Se obtienen dos clones para secuenciamiento. Uno de ellos es un clon de longitud completa con un tamaño de 1.1 kb. Este clon contiene un ORF de 585 bp que codifica una proteína de 194 aminoácidos. Este ORF comprende la secuencia de nucleótido OsICK4 parcial como se identifica en la detección de dos híbridos (supra; ver Figura 10).

La secuencia de nucleótido de este OsICK4 de longitud completa se describe en la Figura 1B y se establece como la SEQ ID NO:43. La secuencia de aminoácido de este OsICK4 de longitud completa se describe en la Figura 11 y se establece como la SEQ ID NO:44. La secuencia genómica de OsICK4 también se determina como se establece aquí en la SEQ ID NO:45 y se describe en la Figura 18.

En Septiembre 30, 2000, la quinta versión del Número de acceso GenBank AC069145 se libera en GenBank. El Número de acceso GenBank AC069145 se identificó previamente por los inventores como que contiene una secuencia putativa OsICK (ver Ejemplo 2). Contrario a las versiones previas, el AC069145.5 ahora tiene el OsICK putativo anotado como un inhibidor dependiente de ciclina putativo identificado por la proteína ID=AAG16867.1. La predicción de ORF y, así, la secuencia de proteína predicha es, sin embargo, diferente del cADN y las secuencias de proteína se determinan experimentalmente mediante la actual solicitud. La proteína OsICK predicha en GenBank (proteína ID=AAG16867.1) contiene una inserción de 48 aminoácidos superfluos y es, por lo tanto, casi ciertamente funcionalmente inactivo. La comparación de la proteína predicha GenBank y la actual proteína obtenida experimentalmente se establece aquí en la Figura 11.

Los experimentos actuales también demuestran claramente la interacción física de la quinasa Cdc2-Os1 dependiente de ciclina de arroz con el OsICK4 de inhibidor de quinasa dependiente de ciclina de arroz como un clon parcial del último se obtiene por medio de la detección de dos híbridos de una colección de cADN de arroz. Estos datos indican adicionalmente que el terminal NH<sub>2</sub> de 66 aminoácidos del OsICK4 no se requieren evidentemente para la interacción con Cdc2-Os1.

**EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN DE OsICK2 Y OsICK4**

Como se describe en el ejemplo precedente, la detección de colección de cADN de dos híbridos de arroz en la identificación del cADN OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:9) que codifica una proteína OsICK2 de arroz de longitud completa (SEQ ID NO:10) y del cADN OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO:43) que codifica una proteína OsICK4 de arroz de longitud completa (SEQ ID NO:44). La estructura de lectura abierta parcial de la SEQ ID NO:1 codifica, cuando se toma en cuenta un cambio de estructura en el nucleótido 52 de la SEQ ID NO:1, la parte de terminal carboxi de la proteína OsICK2. Cuando se compara con las secuencias de nucleótido SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 9, sin embargo, una longitud de 104 nucleótidos (nucleótidos 1121-1224 en la SEQ ID NO:9) se puede discernir en la región no traducida 3' de la SEQ ID NO:9 que no está presente en la SEQ ID NO:1 (ver Figura 1). Esto indica que los transcriptos primarios OsICK2 son propensos a la selección del sitio de poliadenilación alternativa. Una examinación más cercana de la región no traducida 3' en la SEQ ID NO:9 revela la presencia de dos sitios de poliadenilación de mRNA canónicos (Edwards-Gilbert et al. 1997), a saber AAUAAA (nucleótidos 922-927 en la SEQ ID NO:9) y AUUAAA (nucleótidos 1156-1161 en la SEQ ID NO:9). El segundo de estos sitios no está presente en la región no traducida 3' de la SEQ ID NO: 1 que es consistente con el uso de sitios de poliadenilación alternativos en los transcriptos OsICK2 primarios.

Otra característica interesante de las regiones no traducidas 3' de los dos diferentes transcriptos se deriva más comúnmente del mismo gen OsICK2 relacionado con los ARE clase I (elementos ricos en AU). Los transcriptos que corresponden a la SEQ ID NO:1 comprenden un tal ARE (AUUUA, nucleótidos 419-423 en las SEQ ID NO:1) en donde los transcriptos que corresponden a la SEQ ID NO:9 contienen dos ARE (AUUUA; nucleótidos 1076-1080 y 1161-1165 en la SEQ ID NO:9). También está presente un ARE putativo en la región no traducida 3' de OsICK4 (AUUUA; nucleótidos 729-733 en la SEQ ID NO:43). También están presentes los ARE 3' con relación a los codones de parada en OsICK1 (codón de detención 'TGA': nucleótidos 154-156 de la SEQ ID NO:2; ARE'ATTTA': nucleótidos 596-600, 600-604, 616-620 y 634-638 de la SEQ ID NO:2); en ZmICK1 (codón de detención 'TGA': nucleótidos 350-352 de la SEQ ID NO:5; ARE 'ATTTA': nucleótidos 545-549 de la SEQ ID NO:5) y en PtICK (codón de detención 'TGA': nucleótidos 161-163 de la SEQ ID NO:8; ARE'ATTTA': nucleótidos 284-288 de la SEQ ID NO:8). Se conocen los ARE para conferir inestabilidad a un mRNA (Brewer 1991, Chen and Shiyu 1995, Malter 1989). Los ARE se reconocen adicionalmente mediante proteínas HuR, es decir, un miembro de la familia de proteína Elav ubiquitadamente expresada.

La unión de HuR a ARE (y la cola poli-A) mejora la estabilidad del transcripto (Fan and Steitz 1998). De manera interesante, los transcriptos del ICK p21Cip1 de mamífero se estabilizan luego de radiación UV-C de las células. La estabilización del mRNA p21Cip1 implica HuR e incrementos en los niveles de proteína p21Cip1 (Wang et al. 2000). Se conoce que el p21Cip1 hace cumplir la disminución de la fase S luego de la ocurrencia del daño de ADN, por ejemplo, como un resultado de irradiación UV (Chen et al. 1995). Los ARE son el objetivo de Rnasa E que se conserva de las bacterias a los humanos. De manera importante, los mRNA que contienen más de un ARE se dividen más eficientemente mediante Rnasa E (Wennborg et al. 1995). Así, el transcripto que corresponden a la SEQ ID NO:9 se puede degradar más rápido que el transcripto que corresponde a la SEQ ID NO:1. Sin esperar estar vinculado a la teoría o modo de acción, una doble función se puede contemplar para OsICK2: una primera función relacionado con el control del ciclo celular y que implica cambio rápido de un transcripto inestable y una segunda función se relaciona con la diferenciación (es decir, el retiro del ciclo celular) y/o la disminución del ciclo celular implica la alta estabilidad del transcripto. Alternativamente, la situación opuesta se puede contemplar como la estabilidad del transcripto y la eficiencia de traducción se puede correlacionar positivamente o negativamente (Edwards-Gilbert et al. 1997 para revisión).

Otra posibilidad para la regulación de la función OsICK2 descansa en el hecho que la poliadenilación del transcripto alternativo puede, como lo conocerá el artesano experto, ser específico de tejido y/o específico de desarrollo y/o regular el ciclo celular (Edwards- Gilbert et al. 1997). Los ejemplos notables de genes de ciclo celular de los cuales los transcriptos se poliadenilan alternativamente comprenden reductasa dihidrofolato (DHFR, requerido para la síntesis de ADN durante la fase S y para la reparación del ADN; Noé et al. 1999) y ciclina D1 metazoano (Kiyokawa et al. 1992, Xiong et al. 1991, Yarden et al. 1995). La alternación en la poliadenilación del transcripto DHFR se regula más aún por el ciclo celular (Noé et al. 1999). Los cambios en el sitio de poliadenilación que se utilizan en ciclina D1 ocurren durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Yarden et al. 1995). El proceso de poliadenilación en sí mismo también se regula mediante el ciclo celular: la poli-A-polimerasa (PAP) se inhibe mediante fosforilación mediante complejos Cdc2-ciclina específicos de mitosis (Colgan et al. 1996) y se incrementa la actividad PAP en células estimuladas al ingresar el ciclo celular (Benz et al. 1977, Coleman et al. 1997, Hauser et al. 1978). Será claro por el artesano experto que los mecanismos mencionados anteriormente de la regulación de la expresión de gen también se pueden aplicar a la expresión del gen OsICK4.

Las secuencia de aminoácido de OsICK2 (SEQ ID NO:10) y OsICK4 (SEQ ID NO:44) se alinean con todas las secuencias de aminoácido ICK de longitud completa conocidas en la técnica (ver Figura 2). Las secuencias de

5 aminoácido de OsICK2 (SEQ ID NO:10) y OsICK4 (SEQ ID NO:44) también se alinean con las secuencias de aminoácido parciales de los otros ICK de planta identificados en la presente invención: la secuencia de aminoácido parcial de OsICK1 (SEQ ID NO:11, codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:2), la secuencia de aminoácido parcial de OsICK3 (SEQ ID NO:12 codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:3), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK1 (SEQ ID NO:14 codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:5), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK2 (SEQ ID NO:15 codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:6) la secuencia de aminoácido parcial del Sorgo bicolor ICK (SEQ ID NO: 16 codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:7) y la secuencia de aminoácido parcial del Pinus taeda ICK (SEQ ID NO:17 codificada por la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:8) (ver Figura 3).

10 Las identidades y similitudes entre las secuencias de aminoácido de OsICK2 (SEQ ID NO:10) y OsICK4 (SEQ ID NO:44) y las secuencias de aminoácido de otros ICK de planta conocidos se establecen en la Tabla 6. Los porcentajes de identidad generales entre todos los rangos ICK listados de 23 a 51% y los porcentajes de similitud entre 28 y 59 %.

15 Tabla 6. Porcentaje de identidad (negrilla) y similitud (cursiva) entre las secuencias de aminoácido indicadas. El programa GAP que pertenecen al software GCG (Empaque Wisconsin versión 10.1; Madison, Wisconsin) se utiliza con penalidad de abertura de espacio peso = 8 y peso de longitud =2. At1-7: Arabidopsis thaliana ICK1-7 Os2/4: Oryza sativa ICK2/4 Alf: Medicago sativa (alfalfa) ICK Che: Chenopodium rubrum ICK

	At1	At2	At3	At4	At5	At6	At7	Os2	Os4	Alf	Che
At1	100	34	31	28	31	30	30	24	28	26	32
At2	44	100	30	23	23	35	28	24	23	29	27
At3	37	38	100	46	51	30	34	26	46	41	37
At4	38	36	55	100	34	26	26	31	38	39	27
At5	39	31	59	45	100	27	28	24	38	39	29
At6	37	46	34	36	34	100	49	30	34	24	30
At7	36	40	44	35	38	56	100	30	27	23	29
Os2	31	31	42	35	32	37	37	100	46	30	31
Os4	36	32	53	47	45	41	37	52	100	41	26
Alf	28	37	49	50	45	32	30	38	47	100	26
Che	39	37	42	35	38	37	38	38	36	34	100

20 Se calculan las identidades y similitudes entre las secuencias de aminoácido de las partes relevantes de la secuencia de aminoácido OsICK2 de longitud completa (SEQ ID NO:10) y la secuencia de aminoácido OsICK4 de longitud completa (SEQ ID NO: 43) con la secuencia de aminoácido parcial de OsICK1 (SEQ ID NO:11), la secuencia de aminoácido parcial de OsICK3 (SEQ ID NO:12), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK1 (SEQ ID NO:14), la secuencia de aminoácido parcial del Zea mays ICK2 (SEQ ID NO:15), la secuencia de aminoácido parcial del Sorgo bicolor ICK (SEQ ID NO:16), y la secuencia de aminoácido parcial del Pinus taeda ICK (SEQ ID NO:17). Los resultados de este cálculo se incluyen en la Tabla 7.

25 Tabla 7. Porcentaje de identidad (negrilla) y similitud (cursivas) entre las secuencias de aminoácido indicadas. El programa GAP que pertenece al software GCG (Empaque Wisconsin versión 10.1; Madison, Wisconsin) se utiliza con penalidad de abertura de espacio peso = 8 en peso de longitud =2.

	OsICK1	OsICK2	OsICK3	OsICK4	ZmICK1	ZmICK2	SbICK	PtICK
OsICK1	100	50	15	48	52	48	71	55
OsICK2	64	100	40	36	64	33	41	38
OsICK3	35	44	100	29	25	24	43	47
OsICK4	57	42	36	100	37	75	30	56
ZmICK1	62	69	31	46	100	37	35	39
ZmICK2	57	38	31	81	41	100	37	50
SbICK	86	46	47	38	44	43	100	42
PtICK	55	49	53	67	49	63	46	100

5 Todas las secuencias de proteína ICK de planta, que incluyen la secuencia OsICK2 (SEQ ID NO:10) de la invención, se cargan dentro del software de predicción de estructura secundaria PHD (Rost and Sander (1993) J.Mol.Biol 232, 584-599 y Rost, B. and Sander, C. (1994) Proteins 19, 55-72). Los resultados de este análisis se resumen en la Figura 4. Los motivos ICK conservados 1, 2 y 3 (SEQ ID NO:18, 19 y 20, respectivamente) presentes en todos los ICK de planta como se describe supra no solo se conservan en el nivel de la secuencia de aminoácido sino también en el nivel de la estructura secundaria predicha con motivo 2 que se involucra parcialmente en una lámina  $\beta$  extendida y los motivos 1 y 3 son (parcialmente)  $\alpha$ -helicoidales. Cuando están presentes, los motivos 4 y 6 (SEQ ID NO:21 y 23, respectivamente) se predicen que son (parcialmente)  $\alpha$ -helicoidales. El Motivo 5 (SEQ ID NO:22), cuando está presente, se predice que es parcialmente  $\alpha$ -helicoidal o parcialmente una lámina  $\beta$  extendida. Fuera de los motivos conservados, sin embargo, las estructuras secundarias predichas de todos los ICK de planta, que incluyen la proteína OsICK2 (SEQ ID NO:10) de la presente invención, son diferentes y únicos. Esta observación está claramente en línea con las homologías generales bajas entre los ICK de planta. La proteína OsICK2, en particular, se caracteriza por alargamientos  $\alpha$ -helicoidales extensivos especialmente entre los motivos 5 y 6 y entre los motivos 6 y 4. La región OsICK2 entre los motivos 4 y 3, adicionalmente, solo contienen los segmentos  $\alpha$ -helicoidales predichos y no las láminas  $\beta$  extendidas. Estas características son diferentes de aquellas encontradas en los ICK de planta que pertenecen a la misma familia como OsICK2, a saber alfalfa ICK y ICK de Arabidopsis ICK3, ICK4 y ICK5. La predicción secundaria PHD no se desarrolla para la proteína OsICK4 (SEQ ID NO:44).

10 La secuencia actual y los datos de estructura secundaria, así, claramente distinguen el OsICK2 de los otros ICK de planta y, más específicamente, de los ICK de planta que pertenecen a la misma familia como OsICK2.

#### 20 **EJEMPLO 6: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE OsICK1, OsICK2 Y OsICK4**

##### Aislamiento de ARN

25 Se extrae de ARN total de 100-200 mg de semillas, hojas, raíces, brotes o mesistemas apicales de fracción enriquecida inmaduros. Los tejidos congelados se muelen con nitrógeno líquido en un mortero enfriado en hielo. Se agregan dos microlitos de amortiguador de extracción (1M de Tris-HCl pH 9,1%SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) y un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo (PCI 25/24/1) en el mortero y se continúa el molido hasta que la pasta se descongela. La mezcla se transfiere a un tubo y se hace girar a 10,000 rpm durante 10 minutos. La capa acuosa se remueve y se vuelve a extraer con un volumen igual de PCI. Después de centrifugación (a 10,000 rpm durante 10 minutos) el sobrenadante se precipita a 4°C durante 10 minutos con un volumen 1/10 de acetato de sodio al 3M y 0.8 volúmenes de isopropanol frío. El glóbulo recuperado después de centrifugación se lava dos veces con 70% de etanol/acetato de sodio al 0.1M (pH5.5) antes de volver a suspender en 0.5 ml de H<sub>2</sub>O. El ARN se precipita al agregar un volumen igual de 4M de LiCl y se incuba en hielo durante la noche. El ARN se recolecta mediante centrifugación el glóbulo se lava dos veces con 70% de etanol/acetato de sodio al 0.1M. El glóbulo se drena y se disuelve en aproximadamente 80  $\mu$ l de agua.



Síntesis de cADN

5 La síntesis de cADN se desarrolla utilizando el equipo "sistema de preamplificación Superscript para la síntesis de la primera cepa de cADN" de Gibco BRL. Se mezclan tres µg de ARN total con 0.5 µg de un oligo anclado (dT)<sub>25</sub> y 12 µl de agua DEPC. La mezcla se incuba a 70°C durante 10 minutos y luego se incuba en hielo durante por lo menos 1 minute. Luego se agregan las siguientes soluciones: 2 µl de amortiguador 10X PCR, 2 µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de mezcla de 10 mM de dNTP, y 2 µl de 0.1 M de DTT. Después de una incubación de la mezcla a 42°C durante 5 minutos, se agrega 1 µl de Superscript II RT y se continúa la incubación a 42 °C durante 50 minutos. La reacción se termina a 70°C durante 15 minutos y luego se congela en hielo. Se agrega un µl de RNasa H y la reacción se incuba durante 20 minutos a 37°C.

10 Amplificación de cADN objetivo

El primera cepa de cADN obtenida como se describe en el párrafo anterior se amplifica utilizando PCR, utilizando los siguientes reactivos:

	Amortiguador 10X PCR	5 µl
	Mezcla de 2 mM de dNTP	5 µl
15	Cebador codificante (10 µM)	1 µl
	Cebador anticodificante (10 µM)	1 µl
	Polimerasa de ADN de etiqueta (Boehringer)	0.5 µl
	cADN	2 µl
	agua	35.5 µl

20 Los cebadores utilizados para las amplificaciones de RT-PCR son como se describe en el Ejemplo 2: cebadores con la SEQ ID NOs: 25 y 26 para OsICK1; cebadores con la SEQ ID NOs: 27 y 28 para OsICK2; y cebadores con la SEQ ID NOs: 31 y 32 para OsICK4.

La amplificación del ADN se lleva a cabo utilizando las siguientes condiciones (para amplificación de OsICK4, el cebador hibrida a temperatura que es 58°C en lugar de 55°C):

25	94° C durante 3 min	
	94° C durante 45 seg	
	55° C durante 45 seg	} 15 ciclos por semilla inmadura
	72° C durante 1 min	
	94° C durante 45 seg	
	55° C durante 45 seg	
30	72° C durante 1 min	
	72° C durante 5 min	

Análisis de hibridación

35 Se cargan cincuenta µl de la reacción PCR descrita anteriormente en gel de azarosa al 1.5%. El ADN se transfiere en membranas de nylon (Hybond N+, Amersham) y las membranas se cocinan a 80°C durante 2 horas. La hibridación se desarrolla utilizando el equipo "Hibridación y Detección de Ácido Nucleico Quimioluminiscente North2South" de Pierce. El ADN se prehibrida durante 4 horas a 55°C en el amortiguador de hibridación suministrado por el equipo y luego se hibrida durante la noche en el mismo amortiguador con un inserto OsICK2 o OsICK1 marcado con biotina utilizando el Equipo Cebador Aleatorio de Biotina North2South (Pierce).

Las membranas se lavan dos veces durante 20 minutos a temperatura ambiente en 2X SSC/0.1%SDS y dos veces en 0.5X SSC/0.1%SDS durante 15 minutos a 55°C (a 60°C en el caso de OsICK4). La sonda detección y el desarrollo del sustrato se desarrollan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Detección de sonda y desarrollo del sustrato

5 La detección de la sonda y el desarrollo del sustrato se desarrollan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después del lavado las membranas se bloquean con el amortiguador de Bloqueo North2South durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Se agrega el conjugado de estreptavidina-HRP al amortiguador de Bloqueo North2South en una dilución final 1:300 y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavan cuatro veces durante 5 minutos cada una con amortiguador de lavado North2South a TA y luego se transfiere en el amortiguador de Equilibrio del Sustrato North2South durante 5 minutos a TA. El desarrollo del sustrato se lleva a cabo al cubrir las membranas con una mezcla de solución de luminol/peróxido de solución mejorada durante 10 minutos. Las membranas se colocan dentro de un casete de película durante 1 minuto. La película se desarrolla mediante incubación durante 5 minutos en el desarrollador y durante 5 minutos en la solución fijadora.

#### 15 Resultados

El OsICK1 se expresa predominantemente en los tallos. Los niveles inferiores de la expresión de OsICK1 son evidentes en las raíces, meristemas de tallo, y semillas, en donde ninguna o solo muy baja expresión de OsICK1 se puede observar en las hojas (ver Figura 6). Se expresa el OsICK2 en todos los tejidos de planta de arroz investigados que incluyen las hojas (Figura 6). El OsICK4 también se expresa en todos los tejidos de planta de arroz investigados con una baja expresión en las raíces y una alta expresión en las hojas y semillas (Figura 6).

25 La expresión de OsICK1 surge muy tempranamente durante el desarrollo de la semilla con un pico a 2 días después de polinización (DAP) y luego declina lentamente cuando progresa la semilla. Los transcritos de OsICK2 están presentes abundantemente en las semillas a través de su desarrollo con un pico a 8 DAP (ver Figura 7). Los niveles de transcritos OsICK4 son altamente abundantes en las flores no polinizadas y durante el cebador 3 días del desarrollo de semilla (es decir, el cebador 3 días después de polinización): Después de esto, la expresión del OsICK4 declina gradualmente durante el periodo restante del desarrollo de la semilla (ver Figura 7).

#### **EJEMPLO 7: HIBRIDACIÓN IN SITU DE OsICK2 EN SEMILLAS INMADURAS DE ARROZ**

30 Se desarrolla hibridación in situ de acuerdo con el protocolo de Almeida-Engler et al. (2000) (Methods, in press) con ligeras modificaciones. Se desarrolla fijación utilizando 4% de formaldehído, 2.5% glutaraldehído en 0.1M de amortiguador cacodilato y una incubación de 1 hora bajo vacío. La fijación se refresca y continúa el tratamiento durante 4-5 horas durante la noche a 4 °C. Las muestras luego se deshidratan utilizando etanol, se transfieren al xileno y se embeben en paraplasto. Posteriormente, se cortan las secciones 10 µm y se colocan en porta objetos recubiertos con Vectabond. Se desarrolla transcripción in vitro y marcación radioactiva ( $S^{35}$ ) utilizando un equipo de transcripción de Boehringer-Manheim de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este OsICK2 se clona en un vector pSP6 (Roche Diagnostic) en la orientación codificante y en la orientación anticodificante entre el promotor T7. Se desarrolla hibridación y desarrollo de los porta objetos de acuerdo con de Almeida-Engler et al., supra.

40 Se desarrolla análisis de hibridación in situ de la expresión de OsICK2 en semillas de arroz que revela que los transcritos OsICK2 se confinan espacialmente en las capas celulares entre el recubrimiento de semilla y la endosperma desarrollada y exhibe un patrón desigual en el embrión desarrollado en las semillas recolectada a 7 DAP (Figura 8). En las semillas recolectadas a 20 DAP, la expresión de OsICK2 todavía es fuerte en las capas de células entre el recubrimiento de semilla y la endosperma desarrollada, así como también en el escutelo (Figura 9).

#### **EJEMPLO 8: TRANSFORMACIÓN DE ARABIDOPSIS THALIANA CON LOS ICK DE A. THALIANA ICK2, ICK3 Y ICK4**

45 Las regiones codificantes de longitud completa de los ICK A. thaliana ICK2, ICK3 y ICK4 se amplifican mediante la reacción de cadena polimerasa utilizando los cebadores apropiados que introducen diferentes sitios de restricción. Los fragmentos amplificados se digieren con las enzimas de restricción correspondientes y se clonan en los sitios correspondientes de pH35S (Hemerly et al. (1995) EMBO J. 14, 3925-3936) que contiene el promotor CaMV35S y el terminador NOS. Los casetes de expresión se subclonan en pGSV4 (Hérouart et al. (1994) Plant Physiol 104, 873-880). Los vectores resultantes se movilizan mediante el plásmido auxiliar pRK2013 dentro de Agrobacterium tumefaciens C58CIRifR acoge el pMP90 de plásmido. Las plantas A. thaliana del ecotipo Col-0 se transforman mediante el método de inmersión floral (Clough and Bent (1998) Plant J. 16, 735-743). Se obtienen plantas transgénicas en medio que contiene canamicina y después se transfieren al suelo para la producción de semilla óptima. Se genera un total de 39 y 5 líneas transgénicas A. thaliana de las transformaciones con ICK2 y ICK3, respectivamente.

**EJEMPLO 9: PLANTAS DE ARROZ TRANSGÉNICAS GENERADAS CON DIFERENTES PATRONES DE EXPRESIÓN PARA OsICK4**

Se ha producido un número de diferentes construcciones para sobreexpresar o subregular la expresión de OsICK4. La estructura del vector binario es pCAMBIA1301. Las construcciones para modular la expresión OsICK4 se bosquejan adelante.

**Sobreexpresión de OsICK4**

La estructura del vector binario es un vector apropiado, pCDV3 (derivado pCAMBIA1301), dentro del cual se ha introducido el sistema Gateway (Life Technologies, Inc). Los cebadores Gateway se han diseñado para amplificar OsICK4 siguiendo las instrucciones del fabricante. La construcción para la sobreexpresión de OsICK4 bajo el control del promotor GOS2 (de Pater et al. (1992) Plant J. 2, 837-844) se diseña p0428 ICK4 y se describe en la Figura 12.

**Cosupresión de OsICK4**

Para subregular la expresión del gen, se ha producido una conformación de repetición invertida con una estructura de horquilla. Los dos fragmentos invertidos de OsICK4 se separan mediante una región de adhesión de matriz (MAR) de *Nicotiana tabacum* (número de acceso GenBank U67919). El fragmento MAR de 315 bp se ha amplificado por PCR del tabaco ADN genómico utilizando los cebadores codificantes 5'-CGTTGTCAATATCCTGGAAATTTTGC-3' (SEQ ID NO:35) y anticodificantes 5'-CTGCCATTCTTTAGAGGGGATGCTTG-3' (SEQ ID NO:36), y subclonan el extremo como dentro de un SmaI-CIP pUC18.

Un primer fragmento de OsICK4 (893 bp) cortado de pAD-OsICK4 (longitud completa) con Ecl136II-HincII se liga al como dentro del corte de pUC18-MAR con Ecl136 II (como). La orientación de la cual se ha restaurado Ecl136 II se selecciona para permitir la escisión del casete de repetición invertido completo (IR) en una última etapa. El segundo fragmento OsICK4 (921 bp) se corta del pAD-OsICK4 (longitud completa) con PstI-HincII (el Ecl136II se incluye en la secuencia) y se subclona en pUC18-Mars- OsICK4 restringido con PstI-HincII en una ligación como pegajosa. El vector pUC18-Mars-OsICK4 se describe en la Figura 13. El casete de repetición invertido final (2,129 bp; denominado OsICK4 IR) se puede tomar utilizando Ecl136II para subclonar en, por ejemplo, un vector de transformación de planta.

**OsICK4 IR con el promotor GOS2**

El vector pCAMBIA 1301 que contiene un promotor 35SCaMV que conduce la expresión de GUS se ha restringido con XbaI y NcoI para reemplazar el promotor 35SCaMV con el fragmento XbaI-NcoI del promotor GOS2 de arroz (de Pater et al. (1992) Plant J. 2(6): 837-844).

Este vector luego se restringe con NcoI y PmlI, y estos sitios rellenados para producir extremos romos. El casete de repetición invertido final (OsICK4 IR) de pUC 18 se toma utilizando Ecl136II y se liga dentro del vector binario. El vector resultante se denomina p0490 y se describe en la Figura 14.

**OsICK4 IR con el promotor prolamina**

El promotor de prolamina 13kDa (654 bp) de arroz (Wu et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39 :885) se ha amplificado por PCR utilizando los cebadores codificantes 5'-GAATTCCTTCTACATCGGCTTAGGTGTAGC-3' (SEQ ID NO:46) y anticodificantes 5'- CCATGGTGTTGTTGGATTCTACTACTATGC-3' (SEQ ID NO:47) y el ADN genómico subsp. Japonica. El fragmento se subclona adicionalmente en pUC18 SmaI CIP. Una restricción XbaI y NcoI producida por un fragmento promotor que se subclona dentro del vector pCAMBIA 1301 35SCaMV-GUS también se restringe con XbaI y NcoI. Esto conduce al reemplazo del promotor CaMV mediante el promotor prolamina. Este vector binario prolamina-GUS luego se restringe con NcoI y PmlI para introducir el casete IR. Después de rellenar estos sitios para producir extremos romos, el casete IR Ecl136II final (OsICK4 IR) se toma del pUC18 y se liga dentro del vector binario. El vector resultante se denomina p0489 y se describe en la Figura 15.

**OsICK4 IR con promotor oleosina**

El promotor oleosina 18kDa (1236 bp) del arroz (Wu et al. (1998) Plant Cell Physiol 39:885) se ha amplificado por PCR utilizando cebadores codificantes 5'-GAACAAAGATGGTCAGCCAATACATTGATC-3' (SEQ ID NO:48) y anticodificantes 5'- GGCCATGGCTAAGCTAGCTAGCAAGATGAA-3' (SEQ ID NO:49) y el ADN genómico subsp. Indica. El fragmento se subclona adicionalmente dentro de pUC18 SmaI CIP. Una restricción de XbaI y NcoI que produce un fragmento de promotor que se subclona dentro del vector pCAMBIA 1301 35SCaMV-GUS también se restringe con XbaI y NcoI. Esto conduce al reemplazo del promotor CaMV mediante el promotor oleosina. Este vector binario oleosina-GUS luego se restringe con NcoI y PmlI para introducir el casete IR. Después de rellenar

estos sitios para producir extremos romos, el casete IR Ecl136II final (OsICK4 IR) se toma del pUC 18 y se liga dentro del vector binario. El vector resultante se denomina p0488 y se describe en la Figura 16.

OsICK4 IR con promotor glutelina

5 El promotor glutelina 3A (984 bp) del arroz (Wu et al. (1998) J. Biochem. 123: 386) se ha amplificado por PCR utilizando cebadores codificantes 5'-AGAAGAAAGATAAATAACCGAAACTATTTG-3' (SEQ ID NO:50) y anticodificantes 5'-GGACATGTTTTGTGGGACTGAACTCAATG- 3' (SEQ ID NO:51) y el ADN genómico de subsp. Indica. El fragmento amplificado se subclona adicionalmente en pUC 18 Smal CIP. Una restricción de Smal y AflIII que produce un fragmento de promotor que se subclona dentro del vector pCAMBIA 1301 35SCaMV-GUS se restringe con Smal y NcoI. Esto conduce al reemplazo del promotor CaMV mediante el promotor glutelina. Este vector binario de glutelina-GUS luego se restringe con BgIII y PmlI para introducir el casete IR. Después de rellenar estos sitios para producir extremos romos, el casete IR Ecl136II final (OsICK4 IR) se toma del pUC 18 y se liga dentro del vector binario. El vector resultante se denomina p0559 y se describe en la Figura 17.

#### EJEMPLO 10: TRANSFORMACIÓN DEL ARROZ MEDIADA POR AGROBACTERIUM

15 Las semillas secas maduras de los cultivos japonica Nipponbare o Taipei 309 de arroz se descascaran, se esterilizan y se germinan en un medio que contiene 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Después de la incubación en la oscuridad durante cuatro semanas, se cortan y se propagan el callo derivado de escutelo, embriogénico en el mismo medio. El callo embriogénico seleccionado luego se cocultiva con Agrobacterium. Se pueden utilizar las cepas Agrobacterium ampliamente utilizadas tal como LBA4404 o los vectores de T-ADN binarios C58 acogidos. El gen hpt en combinación con higromicina es adecuado como un sistema de marcador seleccionable pero se pueden utilizar otros sistemas. El callo cocultivado se hace crecer en medio que contiene 2,4-D durante 4 a 5 semanas en la oscuridad en la presencia de una concentración adecuada del agente selectivo. Durante este periodo, se hace crecer rápidamente el desarrollo de islas de callo resistentes. Después de la transferencia de este material a un medio con una concentración reducida de 2,4-D e incubación en la luz, el potencial embriogénico se libera y los brotes se desarrollan en las siguientes cuatro a cinco semanas. Los brotes se cortan del callo y se incuban durante una semana en un medio que contiene auxina del cual ellos se pueden transferir al suelo. Los brotes más duros se hacen crecer en alta humedad y días cortos en un fitotrón. Las semillas se pueden cosechar tres a cinco meses después de transplante. El método produce transformantes de locus único en un índice de 50 % (Aldemita and Hodges (1996), Chan et al. 1993, Hiei et al. 1994).

#### EJEMPLO 11: INTERACCIÓN DE DOS HÍBRIDOS DE OsICK2 Y OsICK4 CON CDC2-Os1 y CYCD30

30 Las interacciones de OsICK2 y OsICK4 con Cdc2-Os1 y CycD3-Os (la ciclina D3 del arroz) se verifican utilizando un método de dos híbridos de levadura. En una etapa preliminar, la cepa de levadura PJ69-4A (MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4(eliminado) gal80(eliminado) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) se transforma con Cdc2-Os1 en el vector de cebo pBDGal4 (Stratagene), utilizando el método de acetato de litio, bien conocido por aquellos expertos en la técnica. El Cdc2- Os1 de arroz se obtiene previamente por PCR como se describe en el Ejemplo 1. El Cdc2-Os1 también se clona en el vector presa pADGal4. Las uniones entre el dominio de unión pBDGal4 y el dominio de activación pADGal4 y el fragmento Cdc2-Os 1 se secuencian para verificar la fusión en estructura correcta.

40 Los clones cADN de OsICK2 y OsICK4 de longitud completa del vector pADGa14 se obtienen como se describe en los Ejemplos 3 y 4. Estos cADN también se clonan en el vector pBDGa14. La base de datos pública se detecta para los motivos conservados encontrados en toas las ciclinas tipo D. Esta búsqueda que produce un acertamiento que consiste de un clon EST de arroz (número de acceso GenBank AU082424). Se desarrolla PCR para amplificar una parte de este clon utilizando los siguientes cebadores: anticodificantes 5'-ACTCCTTGTCCTATCGACACACC- 3' (SEQ ID NO:52) y codificantes 5'-CCATGGGGGACGCCTCGGCATCGA-3' (SEQ ID NO:53). El fragmento amplificado se clona en pUC 18 y se utiliza como una sonda radioactiva para la detección de colección de cADN de dos híbridos.

45 Se detectan aproximadamente 750,000 unidades formadoras de placa de la suspensión de colección de cADN de dos híbridos. Las placas se transfieren a membranas Hybond N+ (Amersham). Los filtros obtenidos se prehibridan en fosfato de sodio al 0.25M, (pH7.2), SDS 7% a 60°C durante 4 horas. Se desarrolla hibridación con el amortiguador de prehibridación que contiene 50 ng de la sonda marcada [ $\alpha$ ]<sup>32</sup>P-dCTP- a 60 °C durante la noche (protocolo de Church G.M. and Gilbert W. PNAS USA 81:1991-1994). Los filtros se lavan dos veces con 1XSSC, 0.1% de SDS a 60 °C durante 30 minutos y luego una vez con 0.1XSSC, 0.1% de SDS a 60 °C durante 30 minutos. Las membranas se colocan dentro de un casete de película y se exponen para filmar durante 6 horas.

55 Se identifican dos clones positivos putativos. Se desarrolla una segunda ronda de detección en estos clones. Las placas positivas puras se aíslan y los fagémicos se cortan de estas. El secuenciamiento de los dos clones que considera que clones son idénticos con un tamaño de longitud completa de 1.7 kb. Los clones que contienen un

5 ORF de 1140 bp que codifica una proteína de 380 aminoácidos. Esta proteína se designa ciclina D3 de arroz (CycD3-Os). La cepa de levadura PJ69-4a que contiene el vector de cebo pBDGal4 con Cdc2-Os1 se vuelve a transformar con el vector presa pADGa14 que contiene el OsICK2 o CycD3-O en estructura, y se coloca en placas selectivas Leu- Trp- His- para selección para crecimiento. La levadura que expresa ambas proteínas se puede hacer crecer efectivamente, que ilustra la interacción de Cdc2-Os1 con OsICK2 y CycD3-Os, respectivamente.

10 Como controles positivos, se evalúa el crecimiento en la levadura que contiene el vector presa pADGa14 con Cdc2-Os1 y se vuelve a transformar con el vector de cebo pBDGal4 que contiene OsICK2 o CycD3-Os. En todos los casos, ocurre el crecimiento de levadura. Los controles negativos apropiados se incorporan en cualquiera de los vectores de cebo descritos pBDGal4 o de presa pADGal4 que contienen Cdc2-Os1, OsICK2 o CycD3-Os se combinan con los vectores presa vacíos pADGal4 o pBDGal4, respectivamente. Ninguna de estas combinaciones es capaz de sostener el crecimiento de la levadura en el medio selectivo.

A partir de la clonación molecular de OsICK4 (ver Ejemplo 4), es evidente que el OsICK4 interactúa físicamente con Cdc2-Os1.

15 En experimentos adicionales, se evalúa la interacción entre OsICK2 y OsICK4 con CycD3-Os, respectivamente. Ambos OsICK2 y OsICK4 se muestran para interactuar con CycD3-Os en un sistema de dos híbridos de levadura como se describió anteriormente.

### EJEMPLO 13: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES ICK EN CÉLULAS BACTERIANAS

20 En este ejemplo, las moléculas ICK de la presente invención se expresan como un polipéptido de fusión glutatona-Transferasa recombinante (GST) en *E. coli* y el polipéptido de fusión se aísla y se caracteriza. Específicamente, las moléculas ICK se fusionan a GST y este polipéptido de fusión se expresa en *E. coli*, por ejemplo, la cepa PEB199. La expresión de la proteína de fusión GST-ICK en PEB 199 se induce con IPTG. El polipéptido de fusión recombinante se purifica a partir de lisatos bacterianos crudos de la cepa PEB199 inducida mediante cromatografía de afinidad en glóbulos de glutatona. Utilizando análisis electroforético de gel de poli(acrilamida) del polipéptido purificado de los lisatos bacterianos, se determina el peso molecular del polipéptido de fusión resultante.

### 25 EJEMPLO 14: AISLAMIENTO DEL CLON GENÓMICO DE OsICK5 DE ARROZ Y PREDICCIÓN DEL cADN OsICK5 Y LAS SECUENCIAS DE PROTEÍNA.

30 Las bases de datos públicas se detectan para el motivo de aminoácido "GRYEW" ubicado en el terminal carboxi de todos los ICK. Esta búsqueda produce un acertamiento con un clon HTGS de longitud completa no anotado (número de acceso GenBank AP003525). Se desarrolla PCR para amplificar este clon genómico utilizando los siguientes cebadores:

-codificante: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACAATGGGGAAGAA GAAGAAGCGCGACG -3' (SEQ ID NO:57); y

-anticodificante: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGCCGCTGCCAC CGCGG -3' (SEQ ID NO:58).

35 El fragmento amplificado se clona en el pDON201 (Gateway system; Life Technologies). Dichos cebadores codificante y anticodificante (SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:58, respectivamente) se utilizan posteriormente para aislar el cADN OsICK5 de longitud completa RT-PCR (ver, por ejemplo, Ejemplo 6). El clon genómico OsICK5 aislado (SEQ ID NO:56; Figura 19) es parte del clon HTGS con número de acceso GenBank AP003525 (versión 1) pero no la estructura de lectura abierta o se presenta la anotación de la proteína. Por lo tanto, se predicen el marco de lectura abierta y la proteína deducida del mismo. El cADN OsICK5 de longitud completa predicho se define por la SEQ ID NO: 54 y la secuencia de proteína OsICK5 deducida del mismo se define por la SEQ ID NO:55. Durante el proceso de predicción, surgen dificultades en definir los límites de exón-intrón correctos. Estos desaciertos se reflejan en la secuencia de cADN OsICK5 (SEQ ID NO:54; Figura 20A) mediante los dos nucleótidos 'N' (es decir pueden ser cualquier nucleótido (A, T, C o G) o una resistencia de tales residuos de nucleótido) en las posiciones 40 355 y 356 de la SEQ ID NO:54. Como se define en la SEQ ID NO:54, la resistencia de los nucleótidos inciertos pueden tener una longitud de cero a 265 nucleótidos, es decir la longitud máxima entre el intrón involucrado. Dichos nucleótidos inciertos se traducen en un cierto residuo de aminoácido X (es decir puede ser cualquier residuo de aminoácido o una resistencia de tales residuos de aminoácido) en la posición 119 de la SEQ ID NO:55. Como se define en la SEQ ID NO:55, las resistencias de los aminoácidos inciertos pueden tener una longitud de cero a 88 45 aminoácidos, es decir la secuencia de la proteína máxima deducible del intrón completo involucrado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CROPDESIGN N.V., et al.

<120> INHIBIDORES NOVEDOSOS DE QUINASA DEPENDIENTES DE CICLINA DE PLANTA

<130> CNN-003PC

5 <150> 60/218,471

<151> 2000-07-14

<150> 60/241,219

<151> 2000-10-13

<160> 59

10 <170> FastSEQ para Versión Windows 4.0

<210> 1

<211> 493

<212> ADN

<213> Oryza sativa

15 <221> misc\_feature

<222> 52, 180, 181, 186, 461

<223> n = A,T,C o G

<400> 1

```

ccgccgagat cgaggcggtc ttcgcgccgg ccgaggaggc tgaggccaag cnttcgccgc 60
caagtacaac ttcgacgtcg ttcgcgccgt gccctcgac gccggtcggt tcgagtggac 120
tccggtggtc agcagccgaa gctgaagcga gcgtgcagat taagcggag ctagaaaggn 180
nggtancagg ggggcccgt gttagaagg aagcgcagct agagagagga gaagaagaag 240
aagaaaagat gtcaccca aggaataaa ctggaaaagt gggagactac aaaaaaaga 300
gcattatagc ctaacaacca ccgattcgac tctttttct ttcacatttt ctttgcattt 360
ttactcttac tgtgtactag aaagtagtag cagtagtaaa ctagtaattc gtcccagtat 420
ttatcagagg tttatctcga taggaataga tatattatcc nctaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa aaa                                     493
    
```

20 <210> 2

<211> 696

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 2

```

aagctaagct aatcaagct aattagtttt ttaattaatc tgcttaattt gcaaactaat 60
tacctgcga gctgccggtt ttgcaggtac aattacgaca ttgccctcga ccgcccgttg 120
caaggccgct acgagtggga gccagtgagc acgtgaaagg gaggggtaga agtgtcaact 180
caactcacac ccatgtctgc aactcacaag tgatgcaaag ctagcttaat catcagcagc 240
taattatctg ggagaggctg gggatcgagt tagtgacctt gtttctcctg ctaattctca 300
attagggaat taattaatta ctctcaatc ctcatctcca cctgttgta gttggatctc 360
actaccatat atatctcagc tctgtcaatt aatcttttgt atagtggta ggaaataatc 420
aaggataatc cagggtgattt ggaggatgct tctgatgagc tcccctcttg ctaattacta 480
atatgtatct tccacataat ttgcctaat ttactgttta ttactactta ttaagccctt 540
tcaaaaataa gtatttcatc cgtttcacaa ggtaagactt tctagcattg tacacattta 600
tttatatatt aatgaattta gacatatgta ttgatttaga atcattaata tctatatgta 660
tatgtgcaat gctagattgt cttatattgt aaaacg 696

```

<210> 3

<211> 415

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 3

```

ctcctgtgta gtcactaata agcacaatc ttatatttca aaattaaacc atacgtaagt 60
cgaaaatttt attttcaaaa aggtaattcg tgacaatttt ttttctagct tagtaattaa 120
ttacctgtc agtctgtcac aactcacac tcacactaat taactcttgc ttctactctc 180
tccaattcag aaagtctttg aagccaaatt ctgttcccg cgaagtggcg gcggaacacg 240
ccggcgagca caagcacaac cctgcagccg ccgcccgggc cggccgcccg ccaccgctgt 300
cgccgcccga agcggagatc gaggcgttct tgcgccgccc ggagctcgcc gagcgcgggc 360
gattcgcaga gaagtacgta tacacacaca cataatcact catctctctc tagct 415

```

<210> 4

<211> 1614

10 <212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 4

```

ttcttgccc atgccccaa attgtcacca ccattaaatg tttgaggta aaggagggg 60
cctccccgt ccccaacaagt actagaagtt gatttgttg tgatcttgg ttcaagctag 120
ggggatggaa gaacatttta ggatcagcta gctaggctac tactactact acttgcttct 180
gcagttcttg gcaggataat atttttagct actactactg tatctcacia gctagcaaac 240
gttcttggt cttagcactat cttgtggagg tgggggatct tcctcagcct aaacaggta 300
aagaccctat tttgctggcg tgtcctttgg tgtaggatag ctccatttgt tagcttgaat 360
tgtgtgaaa atacatgggt tgcacatca ccgaagtacc caagagtggg ggcaacttgc 420
ttgcaaggga caaagggcgt gccgtatgag agagatgagc aagtgtgctg .tcatttttgg 480
tttgtcatct tgggtgcaag atcaagcagc aggtgtcaca ggactcacca cagcttgggc 540
tgtccttggg gcccatgtc caaggggtgca ttcattgcac ctctctagc catggcctaa 600
tgggtgcatac ttctgtgctt caaggactgt tgtctttgaa ccattgatgg atatctatct 660
gcatccattt gttttaatcc ttggaagcac catgctggc ctaaatagtg tgatctgaac 720
agtgagcatc taagctagcc atggccctcc caagcatttg ccattggtgga agctgcagtg 780
cagagtccag atgtggtggt gttgctgggc cactgttggg gaccgtccta ccacctttg 840
catgcagcag cagccagcag cagcttcgga tggcgggtgct tgggtctcta ggatggagtt 900
atggccgggg ggatcacctc acctgagcta gtcattgatg tcagatatgg gagctcctta 960
gacaaaacca ttttcttggg tcaactggcc ttgtgtttgg ttgtccccta gcctttttt 1020
ggcatgtgag ataaacattc agaggtggaa catggtttat tttgcaggac cacggcgatg 1080
ctgatttttt ttctcaatat taccgggtgca tttttcttgt ttagtttttg gtacaaaaga 1140
aaaaaaaagt tacgttgcac gttctgtttt aaatttggat gcttttggtt cttgcaggaa 1200
taccagggag acgacacctt gcagcttgat cagggacccc gatacgatta gcaccctgg 1260
atctaccaca aggcagcagc actcaggttc tcatlgcaag gtgcaaacac ccgtgcgcca 1320
caacattatt ccagcatcag cagagctgga agcgttcttc gctgccgaag agcaacggca 1380
acgacaggtt ttcacgaca agtacgatct tgctttgctc ttctattatg ttcagtaaat 1440
atatccctgg atgcatttg ataatgtcca tggccttgca acttagaaat actataatgg 1500
tgtattatcg ctgactgaca atttaacttc tttgtcgtaa tcttcaggta taactttgat 1560
cctgtgaatg actgcctct tcccggccgg tttgaaatgg tcaagctaga ctga 1614

```

<210> 5

<211> 568

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<221> misc\_feature

<222> 32

<223> n = A,T,C o G

<400> 5

```

aggttacggg gatcacgtcc cggatgtcgt cncgcgagc aactcgggga gcgtcccgga 60
ccgcgagagg agagagacga cgccatcgtc gagccgggcg cacggcggcg agctcagcga 120
tctggagtcg gatctggtgg ggccgagaaa gactggctgc tcgtcgtcgc cggcgacaac 180
aacatcggct gcggagctga tcgtgccgcc agcacaggag atccaggaat tcttcggcgg 240
cgccgagggc gcccatgcca aacgctttgc ttccaagtac aacttcgact tcgtccgagg 300
cgtgcccctc gacgccggcc ggttcgagtg gacgccaggg gtcagcatct gaagcgagcg 360
tgcgggtgcaa ggtgaagcta ctactagcta gaaagtgag agaaaaaaag aaaagatgcc 420
gccaaaaaaa cataacggaa aggagaaaag gcaaaggagc tttataggct agctaagcta 480
accaccattc aacatctgcc ttgctttttt ctccggagta gactttaga atgacagcgt 540
agttatttac tgtttatcca gaggttat 568

```

10

<210> 6

<211> 543

<212> ADN

<213> Zea mays

15 <400> 6



```

cgagtcggag gccatgggga ggaataccag ggagacgacg ccctgcagct tgattaactc 60
tgagatgatc agcactcccg gatccacaac aagatccagc cactcttccc accgcagggt 120
gaaagctcct cctgtgcacg ccatcccgaag ttcaacggag atgaacgagt acttcgctgc 180
tgaacagcga cgccaacaac aggctttcat tgacaagtac aactttgatc ctgtaaatga 240
ctgccctctc ccaggcaggt ttgaatgggt gaagctagac tgatagattc agaggacatg 300
agagcagcag catggaactc acctccgctc cctccaccgc cgcagcgtcg tggcagaggg 360
gcataccgct gtgttagctt tgtttctgtt gtaaaaactt agcgttagct tgtagcctta 420
attgtcgcgt gtcacagtac agaactgatg ctgagttaca gcaccctgat atgatctggt 480
ccctcaactc caatgtaacc cttaacagct cattctgtaa ggaacctatc atcctgttac 540
cag 543

```

<210> 7

<211> 1334

<212> ADN

5 <213> Sorgo bicolor

<400> 7

```

atgggcaagt gcgtcaggat ccgcggcagc agcagcaagc cggccccggc ggccggccgc 60
gaggccgagg cgcgctcgtc gtgcctcacg ctgcgcagcg gccgcccgtg gccgcccgtg 120
gcagcggcgt gccgcccgcg gaggaccagc gccagggcgc ggcgccaccg cgcgggggtct 180
gccctccgac gatggtcggg cgcgcccagc gcccgggaca agcaggtgca gcagcgcgcg 240
tgccggcagc cccggcggg gagtgacga gcccggtgct tcggtctcgg actcgggtgca 300
cgccggcagc tctgccacga cgacgggagg acgacggagg cggaggtgcc gccgtcggc 360
gcggcagata tcggcgtcga cgacgggagg ggagactgct tgagtgagtg cagtttttat 420
ttattcctgc tgccttcat tcttcggatc acaattcaca aaacaaagcc agtttttagt 480
gttttttttt tgcgaggata agccagtttt cagttaatcg caaaaggaaa gccaattttc 540
agtttcgagg aaatttacga aacaatatat atcatatact ctctccattc caaattgtaa 600
gtcattacaa gaatcttggg gagtcaaact tttctaagtt tgaccaaat tatattataa 660
aataataata attatgatac taactaagta tcattagatt ctttcttaat tatatttaa 720
tagtatactc actttacggt ataaatctta gtatttttct ttataatttt ggtcaaactg 780
gaaaatgctt tgactcttta agattcttaa aatgatttac aatttgggat ggagagagta 840
tttgacagc ttattttttt tttttgagca tgtcaagtta tatattcatc aggacacaat 900
cgtaattaa ccagttggtt ttaatgcttt caaatcgtgt ttatatatat acatatataa 960
gcagacaaa gacgcccctg atgaccggcg acgactgcga cgcggccgtg gtgaaagtga 1020
aggcgaaca cgagaacgag agccgctgca ggggcctcgt cgcgccaga cgcgctcgc 1080
accgcccgc cgcgcccgc cgccgacgga agccgagata gaggccttct tcgcccggc 1140
cggagctcgc cgagcggcgg cgatttgacg agcggtaagc accacggcgt ttgggacggt 1200
gggtgactgt aatctagctt gtacaagtcg ttggtgacg ggagctcggc acgccttctc 1260
gcaggtacaa ttacgacggt gccctcgact gcccgttgga agggcgcttc gaatggacgc 1320
cgggtaaac gtga 1334

```

<210> 8

<211> 595

10 <212> ADN

<213> Pinus teeds

<221> misc\_feature

<222> 520, 531, 537, 574, 584, 594

<223> n = A,T,C o G

15 <400> 8

```

gcaaaacgaa ggtaggagtg ctccaacctc acatgaaatg gaggaattct ttgctggggc 60
agagcaacag caacaaaggc tgttcataga aaggtaacaat tatgatcctg tcaatgactt 120
gccctttctt ggacgggatg agtgggtcag gttgagacca tgagagtagc gtcactctctt 180
cagactgggc aaaatcactt acttattgtt gaagtgactt cccttcacat atcttttttg 240
gtcaaaatga aaaatacaaa ggaagaggca tttcctgcac atcatttatt agttccagtc 300
agtgcagact gtgaagattg ttacagaaat gtagctgtat gatgtcaatg tataaatatgg 360
gagagtggg cactttcagt tttgtacaga ttcttactgg gatattctcc ttttaaacag 420
aatcccaag catctgtagg aaaaaatgat gcttgtttg ttcattggatc acttactgca 480
atcaaccgcc ttgcctcgtt tcaatgaaac ttttttgacn ccaatcttc ngctgtntat 540
ccccgggtg gttactgctc actcattgta aacncctcga ttcnctacaa aaana 595

```

<210> 9

<211> 1242

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 9

```

ggcacgaggc ggcgcagatg ggcaagtaca tgaggaagtt caggggggccc acgggggagg 60
agttggccgc catggagggtc acgcagggtg ttggcgtccg gacgagggtc aggtcggcag 120
cggcggcggg cgcgacgacg acgaagggtc aggcggcgtc ggcggcgtcc accaggagga 180
ggaaggcgct gctgccgacg gcggtcgtgg ggactactcg ccgtgacggc gggagctgct 240
acctccagct gaggagccgc atgctgttca tggccccgcc gaggccggcg ccggcccgca 300
gggctccggt tgtagcggag gcggcgggtt ccgggaacgg agcggcggcg catgcccggg 360
ctgccctctc gcgttgctcc agcacggcgt cgtccgtgga cgcggcggct caggacagga 420
gcctcgcgtg ccgctccgac gtcgaggagg caggcagcga gcatgtcccg gagggtccg 480
cgagcgactc ggcgagcggc cgtgaccgag agaggagaga aacaactcca tcaagctttc 540
tccccggcga ggtgagcgat ctggagtgg atctggctgg aggacagaag cgcagccgctc 600
cactaccttc tgcggcaaca gcctcagcac agcaagccac gcggccgaag attccgcccg 660
ccgcccagat cgaggcgctt ttcgcccggg ccgaggagge tgaggccaag cgcttcgccc 720
ccaagtacaa cttcgacgct gttcgcggcg tgcccctcga cgcgggtcgg ttcgagtggg 780
ctccggtggt cagcagccga agctgaagcg agcgtgcaga ttaagcggaa gctagaaagg 840
aaggtaacag ggggcgcccgt gtagaaaggg aaggcgagct agagagagga gaagaagaag 900
aaaagatgct catccaaagg gaataaacgg gaaaagtggg agactacaaa aaaagaagca 960
ttatagccta acaaccaccg attcagactc tttttcttc acattttctt tgcattttta 1020
ctcttactgt gtactagaaa gtagtagcag tagtaacta gtaattcgtc ccagtattta 1080
tcagaggttt atctcgatag gaatagatat attatcccct tactgtaatt gcctccatct 1140
tgtatttga tggaaattaa atttactgta cagcagcagc agctgttctg caagttaaag 1200
ttaaccatca ccgttttatt acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1242

```

<210> 10

<211> 262

10 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 10

```

Met Gly Lys Tyr Met Arg Lys Phe Arg Gly Ala Thr Gly Glu Glu Leu
  1           5           10           15

```

Ala Ala Met Glu Val Thr Gln Val Val Gly Val Arg Thr Arg Ser Arg  
 20 25 30  
 Ser Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Lys Val Gln Ala Ala Ser  
 35 40 45  
 Ala Ala Ser Thr Arg Arg Arg Lys Ala Leu Leu Pro Thr Ala Val Val  
 50 55 60  
 Gly Thr Thr Arg Arg Asp Gly Gly Ser Cys Tyr Leu Gln Leu Arg Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Met Leu Phe Met Ala Pro Pro Arg Pro Ala Pro Ala Ala Arg Ala  
 85 90 95  
 Pro Val Val Ala Glu Ala Ala Gly Ser Gly Asn Gly Ala Ala Ala His  
 100 105 110  
 Ala Ala Ala Gly Leu Ser Arg Cys Ser Ser Thr Ala Ser Ser Val Asp  
 115 120 125  
 Ala Ala Ala Gln Asp Arg Ser Leu Ala Cys Arg Ser Asp Val Ala Glu  
 130 135 140  
 Ala Gly Ser Glu His Val Pro Glu Gly Ser Ala Ser Asp Ser Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Asp Arg Glu Arg Arg Glu Thr Thr Pro Ser Ser Phe Leu Pro  
 165 170 175  
 Gly Glu Val Ser Asp Leu Glu Ser Asp Leu Ala Gly Gly Gln Lys Arg  
 180 185 190  
 Ser Arg Pro Leu Pro Ser Ala Ala Thr Ala Ser Ala Gln Gln Ala Thr  
 195 200 205  
 Arg Pro Lys Ile Pro Pro Ala Ala Glu Ile Glu Ala Phe Phe Ala Ala  
 210 215 220  
 Ala Glu Glu Ala Glu Ala Lys Arg Phe Ala Ala Lys Tyr Asn Phe Asp  
 225 230 235 240  
 Val Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Ala Gly Arg Phe Glu Trp Thr Pro  
 245 250 255  
 Val Val Ser Ser Arg Ser  
 260

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 11

Tyr Asn Tyr Asp Ile Ala Leu Asp Arg Pro Leu Gln Gly Arg Tyr Glu  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Pro Val Ser Thr  
 20

<210> 12

<211> 87

10 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 12

Leu Ile Thr Leu Ser Val Cys His Thr Leu Thr Leu Thr Leu Ile Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Cys Phe Tyr Ser Leu Gln Phe Arg Lys Ser Leu Lys Pro Asn Ser  
 20 25 30  
 Cys Ser Arg Glu Val Ala Ala Glu His Ala Gly Glu His Lys His Asn  
 35 40 45

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Arg Arg Pro Pro Leu Ser Pro Pro  
 50 55 60  
 Glu Ala Glu Ile Glu Ala Phe Phe Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Arg Phe Ala Glu Lys Tyr  
 85

<210> 13

<211> 90

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa

<400> 13

Arg Asn Thr Arg Glu Thr Thr Pro Cys Ser Leu Ile Arg Asp Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Ser Thr Pro Gly Ser Thr Thr Arg Arg Ser His Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 His Cys Lys Val Gln Thr Pro Val Arg His Asn Ile Ile Pro Ala Ser  
 35 40 45  
 Ala Glu Leu Glu Ala Phe Phe Ala Ala Glu Glu Gln Arg Gln Arg Gln  
 50 55 60  
 Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn Asp Cys Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys Leu Asp  
 85 90

<210> 14

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Zea mays

<221> VARIANTE

<222> 11

<223> Xaa = Qualquer Aminoácido

15 <400> 14

Gly Tyr Gly Asp His Val Pro Asp Val Val Xaa Ala Ser Asn Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Val Pro Asp Arg Glu Arg Arg Glu Thr Thr Pro Ser Ser Ser Arg  
 20 25 30  
 Ala His Gly Gly Glu Leu Ser Asp Leu Glu Ser Asp Leu Val Gly Arg  
 35 40 45  
 Gln Lys Thr Gly Cys Ser Ser Ser Pro Ala Thr Thr Ser Ala Ala  
 50 55 60  
 Glu Leu Ile Val Pro Pro Ala Gln Glu Ile Gln Glu Phe Phe Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Ala Ala His Ala Lys Arg Phe Ala Ser Lys Tyr Asn Phe Asp  
 85 90 95  
 Phe Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Ala Gly Arg Phe Glu Trp Thr Pro  
 100 105 110  
 Gly Val Ser Ile  
 115

<210> 15

<211> 93

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 15

Glu Ser Glu Ala Met Gly Arg Asn Thr Arg Glu Thr Thr Pro Cys Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Asn Ser Glu Met Ile Ser Thr Pro Gly Ser Thr Thr Arg Ser  
 20 25 30  
 Ser His Ser Ser His Arg Arg Val Lys Ala Pro Pro Val His Ala Ile  
 35 40 45  
 Pro Ser Ser Thr Glu Met Asn Glu Tyr Phe Ala Ala Glu Gln Arg Arg  
 50 55 60  
 Gln Gln Gln Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn Asp  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys Leu Asp  
 85 90

<210> 16

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Sorgo bicolor

<400> 16

Val Phe Asn Ala Phe Lys Ser Cys Leu Tyr Ile Tyr Ile Tyr Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Asp Ala Pro Asp Asp Arg Arg Arg Leu Arg Arg Gly Arg Gly  
 20 25 30  
 Glu Ser Glu Gly Glu Thr Arg Glu Arg Glu Pro Leu Gln Gly Pro Arg  
 35 40 45  
 Arg Arg Gln Thr Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr  
 50 55 60  
 Glu Ala Glu Ile Glu Ala Phe Phe Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Arg Phe Ala Glu Ala Tyr Asn Tyr Asp Val Ala Leu Asp Cys Pro  
 85 90 95  
 Leu Glu Gly Arg Phe Glu Trp Thr Pro Val Asn Thr  
 100 105

<210> 17

<211> 53

<212> PRT

5 <213> Pinus taeda

<400> 17

Gln Asn Glu Gly Arg Ser Ala Pro Thr Ser His Glu Met Glu Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Gly Ala Glu Gln Gln Gln Gln Arg Leu Phe Ile Glu Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asn Tyr Asp Pro Val Asn Asp Leu Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Glu Trp  
 35 40 45  
 Val Arg Leu Arg Pro  
 50

<210> 18

<211> 8

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> motivo 1 ICK consensus

<221> VARIANTE

15 <222> 2, 3, 7

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 18

Phe Xaa Xaa Lys Tyr Asn Xaa Asp  
 1 5

<210> 19

20 <211> 8

<212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> motivo ICK consensus 2  
 5 <221> VARIANTE  
 <222> 1, 3, 6  
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido  
 <400> 19  
 Xaa Leu Xaa Gly Arg Xaa Glu Trp  
 1 5  
 10 <210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> motivo ICK consensus 3  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 4, 7, 8, 9  
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido  
 <400> 20  
 Glu Xaa Glu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa Glu  
 20 1 5 10  
 <210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> motivo ICK consensus 4  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido  
 30 <400> 21

**Tyr Xaa Gln Leu Arg Ser Arg Arg**  
 1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> motivo ICK consensus 5

<221> VARIANTE

<222> 5, 6, 8, 9

10 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 22

**Met Gly Lys Tyr Xaa Xaa Lys Xaa Xaa**  
 1 5

<210> 23

<211> 8

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> motivo ICK consensus 6

<221> VARIANTE

20 <222> 2

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 23

**Ser Xaa Gly Val Arg Thr Arg Ala**  
 1 5

<210> 24

25 <211> 4

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia Cy



<221> VARIANTE  
 <222> 2, 3  
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido  
 <400> 24

5     **Arg Xaa Xaa Phe**  
        **1**

<210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10    <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 25

taactcgatc cccagcctct ccca                   24

<210> 26

15    <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador

20    <400> 26

tacaattacg acattgcctt cgac                   24

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> ADN

25    <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 27

ccgccgagat cgaggcgttc ttcg                   24

30    <210> 28

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> sonda o cebador  
 <400> 28  
 aaacctctga taaatactgg gacg 24  
 <210> 29  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 29  
 15 ctgtcacaca ctccactca cact 24  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 30  
 cgaagaacgc ctcgatctcc 20  
 <210> 31  
 25 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 30 <400> 31  
 gaataccagg gagacgacac cttgc 25

<210> 32  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 32  
 tcagtctagc tggaccatt caaac 25  
 <210> 33  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 15 <400> 33  
 agggatggtt aataccta c 21  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 34  
 gcacagtga agtgaactg c 21  
 25 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> sonda o cebador  
 <400> 35

cgttgtcaat atcctggaaa ttttgc 26

<210> 36

<211> 26

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda o cebador

<400> 36

ctgccattct ttagagggga tgcttg 26

10 <210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de etiqueta 100

<400> 37

Glu Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser  
 1 5 10

<210> 38

<211> 10

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> epítopo c-myc

<400> 38

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 1 5 10

25 <210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> epítopo FLAG

<400> 39

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys**  
 1 5

5 <210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> epítopo HA

<400> 40

**Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala**  
 1 5

<210> 41

<211> 12

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> epítopo de proteína C

<400> 41

20 **Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys**  
 1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> epítopo VSV

<400> 42

**Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys**  
 1 5 10

<210> 43

<211> 1067

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

5 <400> 43

```

gaaaccctag ccccctccca tcccagagtcc cgaccgccat gggcaagtac atgcgcaagg 60
ccaaggtggt ggtctccggc gaggtggtgg ccgccgccgt catggagctc gccgcggcgc 120
cgctcggggg ggcacccgc gcccgctccc tcgctgctgca gaagaggcag gccggggagt 180
acctcgagct caggagccgc aggtctgaga agctccctcc tccccgccg ccgccgccga 240
ggaggagggc gacggctgcy gctgcgactg ctgatgcgac ggcgacggag agcgcggagg 300
cggaggtgtc gttcgggggg gagaacgtcc tcgagctgga ggccatggaa aggaatacca 360
gggagacgac accttgacg ttgatcaggg accccgatac gattagcacc cctggatcta 420
ccacaaggcg cagccactcg agttctcatt gcaaggtgca aacaccctg cgcacaaca 480
ttattccagc atcagcagag ctggaagcgt tcttcgcygc cgaagagcaa cggcaacgac 540
aggctttcat cgacaagtat aactttgate ctgtgaatga ctgccctett cccggccgrt 600
ttgaatgggt caagctagac tgatagattt tcaggaaaag aagggcacca tggacctctc 660
tgctccctcc acagtagtag cgtggcagag gcgcttaccg tcaagttagc tttgatcctg 720
ttgtaaaaaa ttagggttag cctgtagact caatggtcaa tgtgaacata cagaactgat 780
gctgagttac aaccctaata cctcaactac aatgtaacct ttaacagctc attctgtaag 840
gaaccacctc ctcctctagg gcctagctag ccttatcadc tgttattacc agttgctgga 900
ttaatgaagt tagatctaga tattgtgtca cagttaacc tgttgtgtgt gtggtggtag 960
cattggcatt ggcaatggg tatggcagtg tgtgtgtggt gctgcactgc acctcccgaa 1020
gtgctgtaat ttttgtctat acttctgcta aaaaaaaaa aaaaaaa 1067
    
```

<210> 44

<211> 194

<212> PRT

10 <213> *Oryza sativa*

<400> 44

```

Met Gly Lys Tyr Met Arg Lys Ala Lys Val Val Val Ser Gly Glu Val
 1          5          10          15
Val Ala Ala Ala Val Met Glu Leu Ala Ala Ala Pro Leu Gly Val Arg
          20          25          30
Thr Arg Ala Arg Ser Leu Ala Leu Gln Lys Arg Gln Gly Gly Glu Tyr
          35          40          45
Leu Glu Leu Arg Ser Arg Arg Leu Glu Lys Leu Pro Pro Pro Pro Pro
 50          55          60
Pro Pro Pro Arg Arg Arg Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Asp Ala
 65          70          75          80
Thr Ala Thr Glu Ser Ala Glu Ala Glu Val Ser Phe Gly Gly Glu Asn
          85          90          95
Val Leu Glu Leu Glu Ala Met Glu Arg Asn Thr Arg Glu Thr Thr Pro
          100          105          110
Cys Ser Leu Ile Arg Asp Pro Asp Thr Ile Ser Thr Pro Gly Ser Thr
          115          120          125
Thr Arg Arg Ser His Ser Ser Ser His Cys Lys Val Gln Thr Pro Val
          130          135          140
Arg His Asn Ile Ile Pro Ala Ser Ala Glu Leu Glu Ala Phe Phe Ala
          145          150          155          160
Ala Glu Glu Gln Arg Gln Arg Gln Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe
          165          170          175
Asp Pro Val Asn Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys
          180          185          190
Leu Asp
    
```

<210> 45

<211> 3364

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

5 <400> 45

```

gaaaccctag cccctcccc tcccgagtcc cgaccgccat gggcaagtac atgcgcaagg 60
ccaagtggt ggtctccggc gagtggtgg cgcgcccgct catggagctc gccgcccgcg 120
cgctcgggg ggcaccccgc gcccgctccc tcgcgctgca gaagaggcag gccggggagt 180
acctcgagct caggagccgc aggctcgaga agctccctcc tcccccccg ccgcccgcga 240
ggaggagggc gacggctgcg gctgcgactg ctgatgagac ggcggcggag agcgcggagg 300
cggaggtgct gttcgggggg gagaacgtcc tcgagctgga ggccatggaa aggtggggat 360
tctctctctc ttcttattgt gogattcttt ttttgttttt cgtgggtttc ttggttggat 420
tgattggggg aatcgcgtga ttagggttca gggtttaagc accgtacggg agttcttggg 480
gttcgatggt tctatccggg ttttcgcctc ggaaaatttt ggggattttt tttcggtgcg 540
attgtggcgc tcggaattcc tgtggccagt tttggggttt cgaaagtatc gaaatggagg 600
cgaggaaact tttttttttc catcacacgc ggttgtaaag ccccgatgct ttcttgggtg 660
gattcttgtc cctttgctaa ttgagacatg caattcgtgc tttccttgtt gcctaaattt 720
gttctttttc catgtttctt gtggcgatag agccttttct ttttgccaat ttcttgtccc 780
ttagcttgtt tacaagttag aaccattttt aacttctttt gaagaaggga aaaaaagaag 840
aagagaagg gttccaagt ttaatacaa atggttgcaa gaaccacttc tttgcccccc 900
aaatttacct cgaagaatcc ccccaaattt gttattgttt tggatgataa aaaggtagga 960
actgtgcagt agtgctcaag ctctcaactc aaatcccaat tgaaacttga tcaattgatt 1020
gagccccct cttagtgggg ttactcccag tggccatggc ctctgtttt tccttagtgg 1080
aagggaaaag cagcatcctt tccctcctgt tctttgtgtt ttgtttgggg ggtagggacc 1140

```

```

cctctcaatc ttttaccat caaaagcct caccttttgc aagaaatttc tctcataaac 1200
atccttccca aaggcacccc ccatctcacc acccacctca aggcctcatt ctgcaacta 1260
actagcctgt cacttctctg ggttctggaa ggggtgatgaa atggcatgcc ttggtaaaac 1320
catcttctctg gccatgccc ccaaattgtc accaccatta aatgtttgag gtgaaaggag 1380
ggggtcctcc cctccccac aagtactaga agttgatttg ttggtgatct ttggttcaag 1440
ctaggggatg ggaagaacat tttaggatca gctagctagg ctactactac tactacttgc 1500
ttctgcagtt cttggcagga taatattttt agctactact actgtatctc acaagctagc 1560
aaacgttctt ggttctagca ctatcttgtg gaggtggggg atcttcctca gcctaaacag 1620
gtcaaagacc ctattttgcg ggcgtgtcct ttggtgtagg atagctccat ttgttagctt 1680
gaattgtgtg aaaaatacat gggttgacc atcaccgaag tacccaagag tgggggcaac 1740
ttgcttgcaa gggacaaagg gcgtgccgta tgagagagat gagcaagtgc tgcgtcattt 1800
ttggtttgtc atcttgggtg caagatcaag cagcaggtgt cacaggactc accacagctt 1860
gggctgtcct tgggtcccca tgtccaaggg tgcattcatt gcacctcctc tagccatggc 1920
ctaattggtg atacttctgt gcctcaagga ctggtgtctt tgaaccattg atggatatct 1980
atctgcatcc atttgtttta atccttgaa gcaccatgcg tggcctaaat agtgtgatct 2040
gaacagttag catctaagct agccatggcc ctccaagca ttgcatggg tggaaagctgc 2100
agtgcagagt cagcatgtgg tgttgttgcg gggccactgt tgggtaccgt cctaccacct 2160
tttgcagtgc gcagcagcca gcagcagctt cggatgccgg tgcttgggtc tctaggatgg 2220
agttatggcc ggggggatca cctcacctga gctagctatg tgattcagat atgggagctc 2280
cttagaccaa accatthtct tgtttcactt ggccttgtgt ttggtgttcc cctagccttt 2340
ttttggcatg tgagataaac attcagaggt ggaacatggt ttattttgca ggaccacggc 2400
gatgctgatt ttttttctca atattaccgg tgcatttttc ttgtttagtt ttigtataca 2460
aagaaaaaaa agcttacggt gcatgttctg ttttaaatgt gatgctttt gtttcttgca 2520
ggaataccag ggagacgaca ccttgacgct tgatcagggg ccccgatacg attagcacc 2580
ctggatctac cacaaggcgc agccactcga gttctcattg caagggtgca acaccctgc 2640
gccacaacat tattccagca tcagcagagc ttggaagcgtt ctctgctgcc gaagagcaac 2700
ggcaacgaca ggctttcatc gacaagtacg atcttgcttt gctcttctat tatgttcagt 2760
aaatatatcc ctggatgcat tgtgataatg tccatggcct tgcaacttag aaatactata 2820
atggtgtatt atcgctgact gacaatttaa ctctttgtc gtaatcttca ggtataactt 2880
tgatcctgtg aatgactgcc ctcttcccgg ccggtttgaa tgggtcaagc tagactgata 2940
gattttcagg aaaagaaggg caccatggac ctctctgctc cctccacagt agtagcgtgg 3000
cagaggcgtc taccgtcaag tttagcttga tcctgttgta aaaatttagg gttagcctgt 3060
agactcaatg gtcaatgtga acatacagaa ctgatgctga gttacaacc taatccctca 3120
actacaatgt aacccttaac agctcattct gtaaggaacc acctcctcct ctagggccta 3180
gctagcctta tcatctgtta ttaccagttg ctggattaat gaagtttagt ctagatattg 3240
tgtcacagtt taacctgttc tgtgtgtggt ggtagcattg gcattggcaa tgggggatgg 3300
cagtggtgtg gtggtgctgc actgcacctc ccgaagtgtc gtaatttttg tctatacttc 3360
tgct 3364

```

<210> 46

<211> 30

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda o cebador

<400> 46

gaattccttc tacatcggtc taggtgtagc 30

10 <210> 47

<211> 30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>



<223> sonda o cebador  
 <400> 47  
 ccatgggtgtt gttggattct actactatgc 30  
 <210> 48  
 5 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 10 <400> 48  
 gaacaaagat ggtcagccaa tacattgatc 30  
 <210> 49  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 49  
 ggccatggct aagctagcta gcaagatgaa 30  
 20 <210> 50  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> sonda o cebador  
 <400> 50  
 agaagaaaga taaataaccg aaactatttg 30  
 <210> 51  
 <211> 30  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 51  
 ggacatgttt ttgtgggact gaactcaatg 30  
 5 <210> 52  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> sonda o cebador  
 <400> 52  
 actccttgtc cctatcgaca cacc 24  
 <210> 53  
 <211> 24  
 15 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <400> 53  
 20 ccatggggga cgcctcgga tcca 24  
 <210> 54  
 <211> 681  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> sonda o cebador  
 <221> misc\_feature  
 <222> 355, 356  
 <223> n = A,T,C o G  
 30 <400> 54

```

atggggaaga agaagaagcg cgacggcgcg gcggcgagga ggcaggcgcg ggtggtggtc 60
ggcggcggtcc gtacgcgggc cgccgtcacg gcgaggaggg tggtagcgag cgcggaggag 120
ggttggtggtt tggtagggcg tggcggtggc ggtggcagtg gcggagacga tggcgagggc 180
ggatgctatc tgcgtctgcg gagcaggagg ctgcccttcg tggcggccgc ggtggtgctg 240
tcgcgagggg aggaggcgct cggtgattcg gtggcggagg cggcttcgtc gtcgctgctg 300
cgggcgggtgg aattggttggg ctggtctggt gaggaggagg ctatggccga gaagnngagc 360
gcgacgacgc cgtcgagccg ccggccgcgc ggagacgcgg actcgagcga cgcggagtca 420
aaccaggagg ccaagcagca aatgtgccgc cggagttcga cgacctcagc agctgcattt 480
cacgcgggag cgcgcgagag gagcttcagg atgatggcac cgccggcggc ggccggcagag 540
atcgaggagt tcctcgccgc tcgggagagg tccgaggccg agcgcttcgc cgccaagtac 600
aacttcgacg tggtagcgcg cgtgccgctc gacgcggcg gcgccggcg gttcgaatgg 660
accgcgggtg gcagcggctg a 681

```

<210> 55

<211> 226

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda o cebador

<221> VARIANTE

<222> 119

10 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 55

```

Met Gly Lys Lys Lys Lys Arg Asp Gly Ala Ala Ala Arg Arg Gln Ala
 1          5          10          15
Arg Val Val Val Gly Gly Val Arg Thr Arg Ala Ala Val Thr Ala Arg
 20          25          30
Arg Val Val Ala Ser Ala Glu Glu Gly Cys Gly Leu Val Gly Arg Gly
 35          40          45
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Asp Gly Glu Gly Gly Cys Tyr Leu
 50          55          60
Arg Leu Arg Ser Arg Arg Leu Pro Phe Val Ala Ala Ala Val Val Ser
 65          70          75          80
Ser Arg Arg Glu Glu Ala Leu Gly Asp Ser Val Ala Glu Ala Ala Ser
 85          90          95
Ser Ser Ser Ser Arg Ala Val Glu Leu Leu Gly Cys Ser Gly Glu Glu
100          105          110
Glu Ala Met Ala Glu Lys Xaa Ser Ala Thr Thr Pro Ser Ser Arg Arg
115          120          125

```

Pro Pro Gly Asp Ala Asp Ser Ser Asp Ala Glu Ser Asn Gln Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Gln Gln Met Cys Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ala Ala Ala Phe  
 145 150 155 160  
 His Ala Gly Ala Thr Thr Arg Ser Phe Arg Met Met Ala Pro Pro Ala  
 165 170 175  
 Ala Ala Ala Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ala Ala Ala Glu Arg Ser Glu  
 180 185 190  
 Ala Glu Arg Phe Ala Ala Lys Tyr Asn Phe Asp Val Val Arg Gly Val  
 195 200 205  
 Pro Leu Asp Ala Gly Gly Ala Gly Arg Phe Glu Trp Thr Ala Val Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly  
 225

<210> 56

<211> 1073

<212> ADN

5 <213> Oryza sativa

<400> 56

atggggaaga agaagaagcg cgacggcgcg gcggcgagga ggcagggcgg ggtggtggtc 60  
 ggcggcggtcc gtacgcgggc cgccgtcacg gcgaggaggg tgggggcgag cgcggaggag 120  
 ggttgtggtt tgggggccg tggcggtggc ggtggcagtg gcggagacga tggcgagggc 180  
 ggatgctatc tgcgtctgcg gagcaggagg ctgcccttcg tggcggccgc ggtggtgtcg 240  
 tcgcgagggg aggagggcgt cggtgattcg gtggcggagg cggcttcgtc gtcgtcgtcg 300  
 cgggcgggtg aattggtggg ctggtctggt gaggaggagg ctatggccga gaaggtgatt 360  
 gatgagccct agaattcctc cgcggctcga gtgctcgatc gcccgttcc atctcttctc 420  
 gaatgatgcg gcttgggatg tgggtggttt gcaggttgc acgcaggcag cgcgggatca 480  
 cgacgaggag agctccgctc gcgactccgg ctgcggccgc gagaggtgat cgagctcctc 540  
 tccacgcggt cttgcttctc cttgacatga ttaattaca ccgccgttct ctcaattgaa 600  
 ttatcgcaat tcaatccagg agcgcgacga cgccgtcgag ccgcccggccg ccgggagacg 660  
 cggactcgag cgacgcggag tcaaaccagg aggccaaagca gcaaattgtc ccgccggagt 720  
 cgacgacctc agcagctgca tttcacgcgg gagcgcgac gaggagcttc aggatgatgg 780  
 caccgcccgc ggccggcgga gagatcgagg agttcctcgc cgtgcccgg aggtccgagg 840  
 ccgagcgctt cgccgccaag tgagtgtctc atcacatatt gtcgtccgtg cgtcgtgtcg 900  
 tacatatcgt cgtcgtcgtc aaaatcggcc tcgatcgca catgcatggc cgcattggag 960  
 ctgattaacg tgcgctcctc ctctcagggt acaacttca cgtggtgcgc ggcgtgccgc 1020  
 tcgacgcggc cggcgcgggg cggttcgaat ggaccgcggg gggcagcggc tga 1073

<210> 57

<211> 59

10 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador OsICK5 codificante

<400> 57

15 ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt cacaatgggg aagaagaaga agcgcgacg 59

<210> 58

<211> 49

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador OsICK5 anticodificante

5 <400> 58

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt cagccgctgc ccaccgagg 49

<210> 59

<211> 265

<212> ADN

10 <213> Oryza Sativa

<400> 59

```

gtgattgatg agccctagaa ttcctcgcg gctcgagtgc tcgatcgccc gttccatct 60
cttgctgaat gatgaggctt gggatgtggt ggttttgcag gtttgcacgc aggcaggcga 120
ggatcacgac gaggagagct ccgtcggcga ctccggctgc ggccgcgaga ggtgatcgag 180
ctcctctcca cgcgttcttg cttgtccttg acatgattaa ttacaaccgc cgttctctca 240
attgaattat cgcaattcaa tccag 265
    
```

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13 o 44.
2. Un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13.
- 5 3. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43.
4. Un polipéptido ICK aislado que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 44.
5. Un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 13.
- 10 6. Una planta transgénica que comprende un casete de expresión recombinante que incluye un promotor de planta ligado operablemente a la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID NO: 43.
7. La planta transgénica de la Reivindicación 6, en donde la planta es una planta monocotiledónea.
8. La planta transgénica de la Reivindicación 6, en donde la planta es una planta dicotiledónea.
9. La planta transgénica de la Reivindicación 6, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.
- 15 10. Un método para incrementar los números de semillas o vainas de semilla en una planta que comprende regulación descendente de la expresión de un inhibidor de proteína quinasa dependiente de ciclina (ICK) en la endosperma de la planta, en donde dicha proteína ICK es:
  - (a) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o
  - (b) OsICK4 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o
  - 20 (c) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13; o
  - (d) una proteína ICK funcionalmente activa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44; o
  - 25 (e) una proteína ICK funcionalmente activa de acuerdo con cualquiera de (c) o (d) que comprende adicionalmente dos o más y preferiblemente todos los seis de:
    - (i) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido FIDKYNFD;
    - (ii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLPGRWFEW;
    - 30 (iii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido ELEAFFAAEE;
    - (iv) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido YLELRSSRR; y
    - (v) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido MGKYMRRKAK; y
    - (vi) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLGVRTRA.
- 35 11. El método de la Reivindicación 10, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una molécula de ácido nucleico anticodificante.
12. El método de la Reivindicación 11, en donde dicha molécula de ácido nucleico anticodificante es oligonucleótido anticodificante.

13. El método de la Reivindicación 10, en donde la dicha regulación descendente es por medio de una ribozima.
14. El método de la Reivindicación 10, en donde la dicha regulación descendente es por medio de cosupresión.
- 5 15. El método de cualquiera de reivindicaciones 10 a 14, en donde la dicha planta es una planta monocotiledónea.
16. El método de cualquiera de reivindicaciones 10 a 14, en donde la dicha planta es una planta dicotiledónea.
17. El método de cualquiera de reivindicaciones 10 a 14, en donde la dicha planta se selecciona del grupo que consiste de *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, cebada, sorgo, tomate, papa, algodón, alfalfa, colza, soya, girasol, canola y maíz.
- 10 18. El método de cualquiera de reivindicaciones 10 a 14, en donde la dicha planta es arroz.
19. Un método para identificar un compuesto que se une a un polipéptido de las reivindicaciones 2 o 4 que comprende: a) poner en contacto el polipéptido, o una célula que expresa el polipéptido con un compuesto de prueba; y b) determinar si el polipéptido se une al compuesto de prueba.
- 15 20. El método de la Reivindicación 19, en donde la unión del compuesto de prueba al polipéptido se detecta mediante un método que se selecciona del grupo que consiste de: a) detección de la unión mediante detección directa de la unión del compuesto de prueba/polipéptido; b) detección de la unión utilizando un ensayo de unión de competición; y c) detección de la unión utilizando un ensayo para la actividad de ICK.
- 20 21. Un método para identificar un compuesto que modula la actividad un polipéptido de las reivindicaciones 2 o 4 que comprende: a) poner en contacto un polipéptido de la Reivindicación 2 o 4 con un compuesto de prueba; y b) determinar el efecto del compuesto de prueba en la actividad el polipéptido para identificar por lo tanto un compuesto que modula la actividad el polipéptido.
22. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido ICK monocotiledóneo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia general para la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13, y que comprende uno o más y preferiblemente todos los tres de:
- 25 (i) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido FIDKYNFD;
- (ii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido PLPGRWFEW;
- (iii) un motivo que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido ELEAFFAAEE.

30

```

1      GGCACGAGGC GCGCAG (ATGGGCAAGTACA TGAGGAAGTT CAGGGGGGCC
51     ACGGGGGAGG AGTTGGCCGC CATGGAGGTC ACGCAGGTGG TTGGCGTCCG
101    GACGAGGTTC AGGTCGGCAG CGGCGGCCGG CGCGACGACG ACGAAGGTGC
151    AGGCGGGCGTC GCGGCGTCC ACCAGGAGGA GGAAGGCGCT GCTGCCGACG
201    GCGGTTCGTGG GGACTACTCG CCGTGACGGC GGGAGCTGCT ACCTCCAGCT
251    GAGGAGCCGC ATGCTGTTCA TGGCCCCGCC GAGGCCGGCG CCGGCCGCGA
301    GGGCTCCGGT TGTAGCGGAG GCGGCGGGTT CCGGGAACGG AGCGGCGGGC
351    CATGCGGGCG CTGGCCTCTC GCGTTGCTCC AGCACGGCGT CGTCCGTGGA
401    CGCGGCGGGCT CAGGACAGGA GCCTCGCGTG CCGCTCCGAC GTCGCGGAGG
451    CAGGCAGCGA GCATGTCCCG GAGGGCTCCG CGAGCGACTC GCGGAGCGGC
501    CGTGACCGCG AGAGGAGAGA AACAACTCCA TCAAGCTTTC TCCCCGGCGA
551    GGTGAGCGAT CTGGAGTCGG ATCTGGCTGG AGGACAGAAG CGCAGCCGTC
601    CACTACCTTC TCGGCAACA GCCTCAGCAC AGCAAGCCAC GCGGCCGAAG
651    ATTCCGCCGG CCGCCGAGAT CGAGGCGTTC TTCGCGGCGG CCGAGGAGGC
701    TGAGGCCAAG CGCTTCGCCG CCAAGTACAA CTTGACGTC GTTCGCGGGC
751    TGCCCCTCGA CGCCGGTCGG TTCGAGTGA CTCCGGTGGT CAGCAGCCGA
801    AGCTGA) AGCGAGCGTGCAGA TTAAGCGGAA GCTAGAAAGG AAGGTACAGG
851    GGGGCGCCGT GTAGAAAGG AAGGCGAGCT AGAGAGAGGA GAAGAAGAAG
901    AAAAGATGCT CATCCAAAGG GAATAAACGG GAAAAGTGGG AGACTACAAA
951    AAAAGAAGCA TTATAGCCTA ACAACCACCG ATTCGACTCT TTTTCTTTT
1001   ACATTTTCTT TGCATTTTTA CTCTTACTGT GTACTAGAAA GTAGTAGCAG
1051   TAGTAAACTA GTAATTCGTC CCAGTATTTA TCAGAGGTTT ATCTCGATAG
1101   GAATAGATAT ATTATCCCCT [TACTGTAATT GCCTCCATCT TGTATTTGGA
1151   TGGAAATTAA ATTTACTGTA CAGCAGCAGC AGCTGTTCTG CAAGTTTAAG
1201   TTAACCATCA CCGTTTATT ACTT] AAAAAAAAAAAAAAAAAA AA

```

FIGURA 1



```

1  GAAACCCTAG CCCCTCCCA TCCCGAGTCC CGACCGCC (ATGGGCAAGTAC
51  ATGCGCAAGG CCAAGGTGGT GGTCTCCGGC GAGGTGGTGG CCGCCGCCGT
101 CATGGAGCTC GCCGCGGCGC CGCTCGGGGT GCGCACCCGC GCCCGCTCCC
151 TCGCGCTGCA GAAGAGGCAG GGCGGGGAGT ACCTCGAGCT CAGGAGCCGC
201 AGGCTCGAGA AGCTCCCTCC TCCCCCGCCG CCGCCGCCGA GGAGGAGGGC
251 GACGGCTGCG GCTGCGACTG CTGATGCGAC GCGGACGGAG AGCGCGGAGG
301 CGGAGGTGTC GTTCGGGGGG GAGAACGTCC TCGAGCTGGA GGCCATGGAA
351 AGGAATACCA GGGAGACGAC ACCTTGACGC TTGATCAGGG ACCCCGATAC
401 GATTAGCACC CCTGGATCTA CCACAAGGCG CAGCCACTCG AGTTCTCATT
451 GCAAGGTGCA AACACCCGTG CGCCACAACA TTATTCCAGC ATCAGCAGAG
501 CTGGAAGCGT TCTTCGCGYC CGAAGAGCAA CGGCAACGAC AGGCTTTCAT
551 CGACAAGTAT AACTTTGATC CTGTGAATGA CTGCCCTCTT CCCGGCCGRT
601 TTGAATGGGT CAAGCTAGAC TGA) TAGATTTTCAGGAAAAG AAGGGCACCA
651 TGGACCTCTC TGCTCCCTCC ACAGTAGTAG CGTGGCAGAG GCGCTTACCG
701 TCAAGTTAGC TTTGATCCTG TTGTAAAAAT TTAGGGTTAG CCTGTAGACT
751 CAATGGTCAA TGTGAACATA CAGAACTGAT GCTGAGTTAC AACCTAATC
801 CCTCAACTAC AATGTAACCC TTAACAGCTC ATTCTGTAAG GAACCACCTC
851 CTCCTCTAGG GCCTAGCTAG CCTTATCATC TGTTATTACC AGTTGCTGGA
901 TTAATGAAGT TAGATCTAGA TATTGTGTCA CAGTTTAACC TGTTGTGTGT
951 GTGGTGGTAG CATGGCATT GGCAATGGGG TATGGCAGTG TGTGTGTGGT
1001 GCTGCACTGC ACCTCCCGAA GTGCTGTAAT TTTTGTCTAT ACTTCTGCTA
1051 AAAAAAAAAA AAAAAAA

```

FIGURA 2

		1	40
ALFALFA ICK	(1)	MGKYMKKIKSKSESPSPNSTPTPSPSPSPPTPITTNSPPT	
AtICK1	(1)	MVRKYRKAKEGIVEAGVSS-----TYMQL	
AtICK2	(1)	MAAVRRERERDVVEENGVTITTVK-----RRK	
AtICK3	(1)	MCKYMKKSKITGDISVME-----VSKA	
AtICK4	(1)	MCKYIKKSKIDGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVSPS	
AtICK5	(1)	MCKYIKKSKVAGAVSVKD-----KSH	
AtICK6	(1)	MSERKRELAEESSTSFSP-----LKKTK	
AtICK7	(1)	-----MSETKPKRDSEYEGS-----NIKRM	
QUENOPODIO ICK	(1)	MAAAATPTSSPAKIKKVS-----KSS	
OsICK2	(1)	MCKYMKKFRGATGEELAAMEVTQVVGVRTR-----SRSA	
OsICK4	(1)	MCKYMKKAKVVVSGEVVA---A-----AVMEL	
OsICK5	(1)	MGKKKKRDGAAARQARVVVGG-----VTR	
		41	80
ALFALFA ICK	(41)	TPNSSDGVRTRARTLALENSM-----	
AtICK1	(24)	RSRRIVYVRSEKSSSVSVVGD-----	
AtICK2	(27)	MEEVDLVESTRILSPCVQAT-----	
AtICK3	(23)	TA-PSPGVRTRAAKTLALKRL-----	
AtICK4	(41)	SS-SSLGVLTRAKSLALQQQQRCLLQKPSLPTSA	
AtICK5	(22)	P--PALGFRTRAAAKNLALH-----	
AtICK6	(25)	LNDSSDSSPDSDVIVFAVSS-----	
AtICK7	(22)	LDDDDVLRSPTRLSSSSSS-----	
QUENOPODIO ICK	(23)	YN--IPQLRSRKNLSAP--EN-----	
OsICK2	(35)	AAAGATTKVQAASAASTRRR-----	
OsICK4	(25)	AA-APLQVRTRARSLALQKRG-----	
OsICK5	(27)	AAVTARRVVAEEGGLVGR-----	
		81	120
ALFALFA ICK	(63)	-----QNQLSVSSDSYLQLRRLR-----P	
AtICK1	(46)	-----GVSSSCSGSNEYKK-----KEL	
AtICK2	(49)	-----RGGIVARNSAGASETSVMIVRRRDSPP	
AtICK3	(44)	-----SSAADSALPNDSSCYLQLRRLRLEKPSLIEP	
AtICK4	(80)	SPNPPSKQKMKKQOQOMDCGSYLQLRRLRLOK-----KPP	
AtICK5	(42)	-----LRSHSDEADSFNYLQLRRLRVK-----LPL	
AtICK6	(47)	-----SVASSAALASDECSVTIG-GEE	
AtICK7	(44)	-----LAYSVSDSGGFCVASE-----EED	
QUENOPODIO ICK	(41)	-----FAELETTPLEVAAVVEEE	
OsICK2	(57)	----ALLPTAVVGTTRRDGGSCYLQLRRLRMLFMAPPAP	
OsICK4	(46)	-----GEYLELRRLRLEK-----LPP	
OsICK5	(49)	-----GGGGSGDDGEGGCYLRLRLRRLRPFVAAAVVS	

FIGURA 3

		121	160
ALFALFA ICK	(86)	LIRQHSAKRNKGHDGNPKS-----PIGDSIAEETVQK	
AtICK1	(63)	IHLLEEDKDG-----DTETSTYRRGTRK	
AtICK2	(76)	VEEQCQIEEDS-----SVSCCSTSEKSKR	
AtICK3	(76)	KQPPRVHRSGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSNEDECDFN	
AtICK4	(116)	IVVIRSTKRRKQQRNETCGRNPNPRSNLDSIRGDGERSD	
AtICK5	(68)	LNTNRKQKQ-----QLIPSVNQCK--	
AtICK6	(68)	SDQSSSISSGCTS-E-----SKEIAKNSSSFGVD	
AtICK7	(65)	DELSSSISSGCS-----SSETNEIATRLP	
QUENOPODIO ICK	(59)	EVANCSSEVITARSDFP-----PSCCSSNYDQLS--	
OsICK2	(93)	AARAPVVAEAGSGNG-----AAAHAAAGLRCSSST	
OsICK4	(62)	PPPPPR-RR-----ATAAAATADATATE	
OsICK5	(81)	SRREALGDSVAEAS-----SSSRAVELLGC	
		161	200
ALFALFA ICK	(119)	SPPENAEFKEN-----AED-TE	
AtICK1	(87)	LFENLREEEKEE-----LSKSM	
AtICK2	(102)	RIEFVDLEENNG-----DDR	
AtICK3	(116)	FVSVQVSCGENS-----LGFESR	
AtICK4	(156)	SVSESVVFGKDKDLISEINKDPTFGQNFDDLEEEHTQSFN	
AtICK5	(90)	--NPRASSGPAK-----K---LE	
AtICK6	(97)	LEDHQIETETET-----S-TFIT	
AtICK7	(89)	FSDLEAHEISET-----EISTLLT	
QUENOPODIO ICK	(90)	SSPEVVKDDDG-----LGNRTA	
OsICK2	(124)	ASSVDAAAQDRSLACRSVVAEAGSEHVPEGSASDSASGRD	
OsICK4	(85)	SABAEVSVFGGEN-----VLELEAME	
OsICK5	(109)	SGEEAEMAEXS-----ATTPSS	
		201	240
ALFALFA ICK	(136)	RSARETTPVHLIM-RADVLRPPRPIDRRRTFPTEAN----	
AtICK1	(104)	ENYSSEFESAVKE-SLDCCCSGRKTMEETVTAEED----	
AtICK2	(117)	ETETSWIYDDLNK-SEESMNDSSSVAVEDVESRR----	
AtICK3	(134)	HSTRESNPCNFVE-DMELMVTGSSDRSMCRAT-----KE	
AtICK4	(196)	RTTRESNPCSLIR-RPEIMTTPGSSIKLNICVSESNORED	
AtICK5	(103)	PDTTTEACGDNE-RISRDCNFGDKGFDLESE-----	
AtICK6	(114)	SNFRKETSVPSEG-LGETTEMESSATKRRKQP-----	
AtICK7	(108)	NNFRKOGISSSEN-LGETAEMDSATTEMRDORKTE----	
QUENOPODIO ICK	(108)	DPEVESGEASSKQ-KESHRTEAREATKLDDQDYP-----A	
OsICK2	(164)	RERRETTPSSFLPGEVSDLESDLAGGQKRSRPLPSAATAS	
OsICK4	(105)	RNTRETTPCSLIR-DPDTLSTPGSTERRSHSSS---HCKV	
OsICK5	(127)	RRPPGDADSSDAESNOBAKQOMCRRSSTTSAAAFHAGATT	

FIGURA 3 (cont.)

		241	280
ALFALFA ICK	(170)	PKTEQP-TIEISREFREFCAKHEAEQORE---	EMEKYNFD
AtICK1	(138)	EKAKLMTTEMPTESEIEDFFVEAEKQLKEK---	EKKKYNFD
AtICK2	(151)	RLRKSLEHETVKEAELEDFEQVAEKDLRNKLLLECSMKYNFD	
AtICK3	(168)	YTREQDNVIEPTTSEMEEFFAYAEQQQORL---	EMEKYNFD
AtICK4	(235)	SLSRSHRRRRTTPENDEFFSGAEQQQKQ---	EIEKYNFD
AtICK5	(135)	NRSMSISDSKSIQSEIEDEFFASAEQQQORF---	EIQKYNFD
AtICK6	(146)	----GVRKTPFAAEIEDLFSELESQDDKKK-QEIEKYNFD	
AtICK7	(142)	-KKKMEKSEPTQAELEDDFFSAAERYEOKR---	EIEKYNFD
QUENOPODIO ICK	(142)	TKSTVQIKMPSDSEIEEFAVAEKDLQKR---	ESEKYNFD
OsICK2	(204)	AQQATRPKIPPAEIEEFAAAAEAEAKR---	EAAKYNFD
OsICK4	(141)	QTPVRENIIIEASAELEEFAAAEQRQROA---	EIDKYNFD
OsICK5	(167)	RSFRMMAPPAAAEEIEEFLAAAEERSEAE---	EAAKYNFD

		281	305
ALFALFA ICK	(206)	PVTEQPLPG---	RYEPEKVSP---
AtICK1	(175)	FEKEKPLEG---	RYEWWKLE---
AtICK2	(191)	FEKDEPLGGG---	RYEWWKLE---
AtICK3	(205)	IVNDIPLSG---	RYEWWQVKP---
AtICK4	(272)	PVNEQPLPG---	RFEWTKVDD---
AtICK5	(172)	IVSDMPLPG---	RYEWWKVMK---
AtICK6	(181)	IVNDEPLEG---	RYKWDRLE---
AtICK7	(178)	IVNDIPLSG---	RYEWWKLE---
QUENOPODIO ICK	(179)	IVKDVPLKG---	RYDWWKLE---
OsICK2	(241)	VVRGVPLDAG---	RFEWTPVSSRS---
OsICK4	(178)	PVNDIPLPG---	RFEWTKLE---
OsICK5	(204)	VVRGVPLDAGGAGRFEWTAAGSG---	

FIGURA 3 (cont.)

	OsICK2	(121)	SSTASSVDAAAQDRSLACRSVDAEAGSEHVPEGS-ASDSA
OsICK3	parcial	(1)	-----LITLSVC
	OsICK4	(61)	PPPPPPRRRATAAAATADATATESAAEVSFGGENVLEL
	OsICK5	(73)	FVAAAVVSSRREEALGDSVAEAASSSSSRAVELLGCSGEE
	PtICK	(1)	-----
	SbICK	parcial	(1)
	ZmICK1	parcial	(1)
	ZmICK2	parcial	(1)
			-----VFNAFKSCLY
			-----GYGDHVPDVVKASNSG
			-----ES
	OsICK2	(160)	SGRDRERRETTPSS--FLPGEVSDLES <sup>160</sup> DLAGGQKR <sup>160</sup> SRPLP
OsICK3	parcial	(8)	HTLTLTLINSCFYSLQFRKSLKPNSCSREVA <sup>160</sup> A <sup>160</sup> EHAGEHKH
	OsICK4	(101)	EAMERNTRRETTPCSLIRDPDTIS <sup>160</sup> TPG <sup>160</sup> STRSSHSS---SH
	OsICK5	(113)	EAMA <sup>160</sup> E <sup>160</sup> K <sup>160</sup> XSATTPSSRRPPGDADSSDAES <sup>160</sup> NQ <sup>160</sup> EAKQ <sup>160</sup> MCRRS
	PtICK	(1)	-----
	SbICK	parcial	(11)
	ZmICK1	parcial	(17)
	ZmICK2	parcial	(3)
			IYIYKQTKDAPDDRRRLRRGRGSEGE <sup>160</sup> TREREPLQ---GP
			SVPDRERRETTPSSSRAHGGELSDLES <sup>160</sup> DLVGRQK---TGC
			EAMGRNTRRETTPCSLINS-EMISTPGSTRSSHSS---HR
	OsICK2	(198)	SAATASAQQA-----TRPKIPPAEIEA <sup>198</sup> FFAAAEAE
OsICK3	parcial	(48)	NPAAA <sup>198</sup> AAAGR-----RPPLSPPEABIEA <sup>198</sup> FFAAAE <sup>198</sup> LAE
	OsICK4	(138)	CKVQTFVRHN-----I---TPASAEIEA <sup>198</sup> FFAAAE <sup>198</sup> QORQ
	OsICK5	(153)	STTS <sup>198</sup> AAAFHAGATTRSFRMMAPPAAA <sup>198</sup> EIEE <sup>198</sup> FLAA <sup>198</sup> ERSE
	PtICK	(1)	---QNEGRS-----APTSEMEE <sup>198</sup> FFAGAE <sup>198</sup> QQQ
	SbICK	parcial	(48)
	ZmICK1	parcial	(54)
	ZmICK2	parcial	(39)
			RRRQTFSPFP-----PPPPPTEAIEA <sup>198</sup> FFAAAE <sup>198</sup> LAE
			SSSPATTTSA-----AELIVPPA <sup>198</sup> O <sup>198</sup> E <sup>198</sup> I <sup>198</sup> O <sup>198</sup> EFFAAAE <sup>198</sup> AH
			RVKAPPVHA-----IPSS <sup>198</sup> TEMNEYFA <sup>198</sup> AE <sup>198</sup> QORQ
	OsICK2	(230)	AKRFAAKYNFDVVRGVPLDAG---RFEWTPVVSSRS
OsICK3	parcial	(80)	RRRFAEKY-----
	OsICK4	(167)	RQAFIDKYNFDFVND <sup>230</sup> CPLEG---RFEWVKLD---
	OsICK5	(193)	AERFAAKYNFDVVRGVPLDAGGAGRFEWTA <sup>230</sup> VGGG--
	PtICK	(25)	QRLEIERYNFDFVND <sup>230</sup> PLSG---RYEWR <sup>230</sup> LRP---
	SbICK	parcial	(80)
	ZmICK1	parcial	(86)
	ZmICK2	parcial	(66)
			RRRFAEAVN <sup>230</sup> DVALDCPLEG---RFEWTPVNT---
			AKRFASKYNFDFVVRGVPLDAG---RFEWTPGVSI--
			QQA <sup>230</sup> FIDKYNFDFVND <sup>230</sup> CPLEG---RFEWVKLD---

FIGURA 4

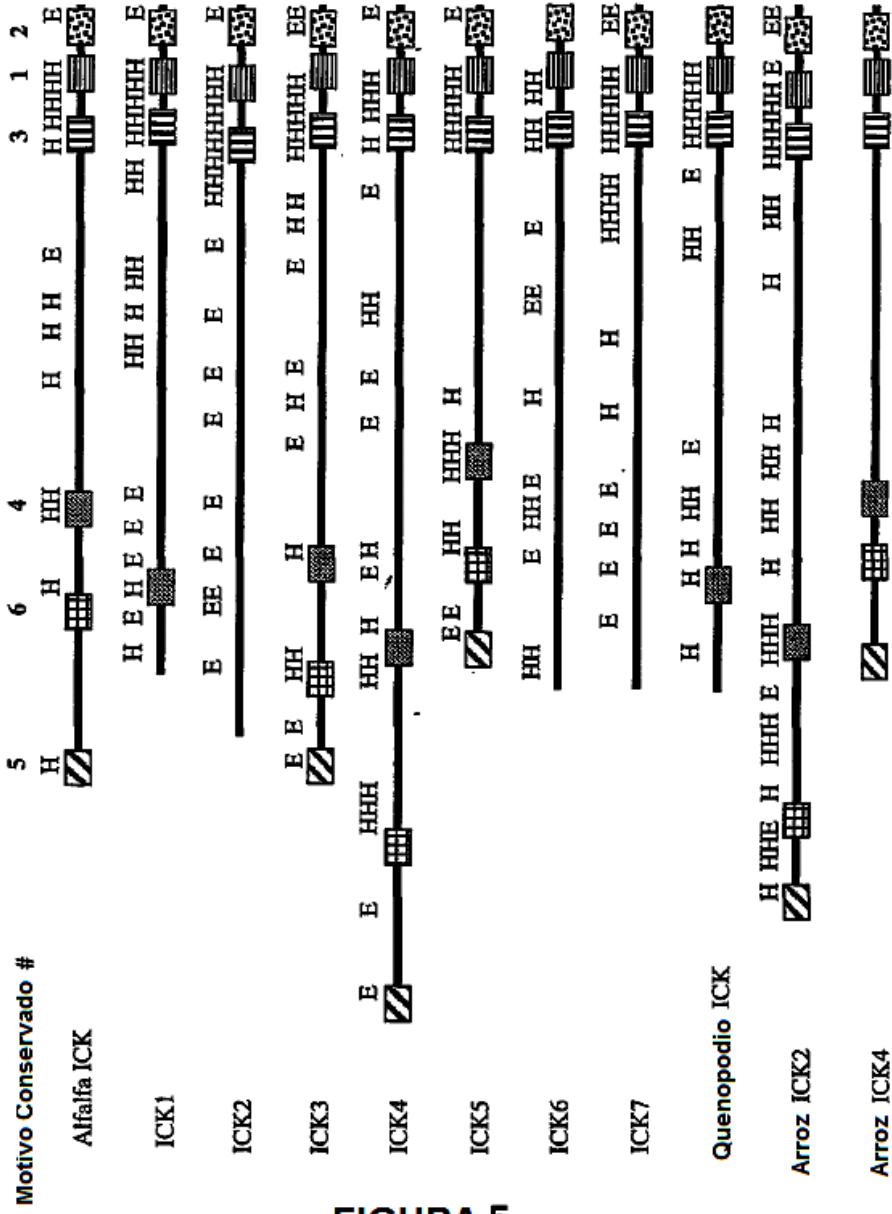
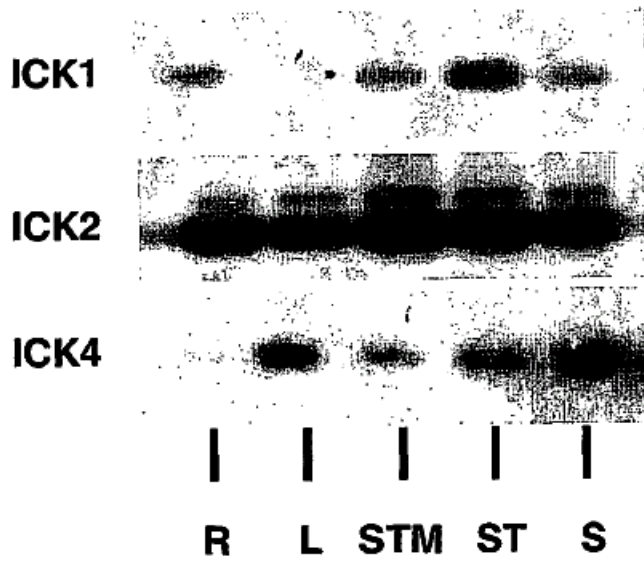


FIGURA 5

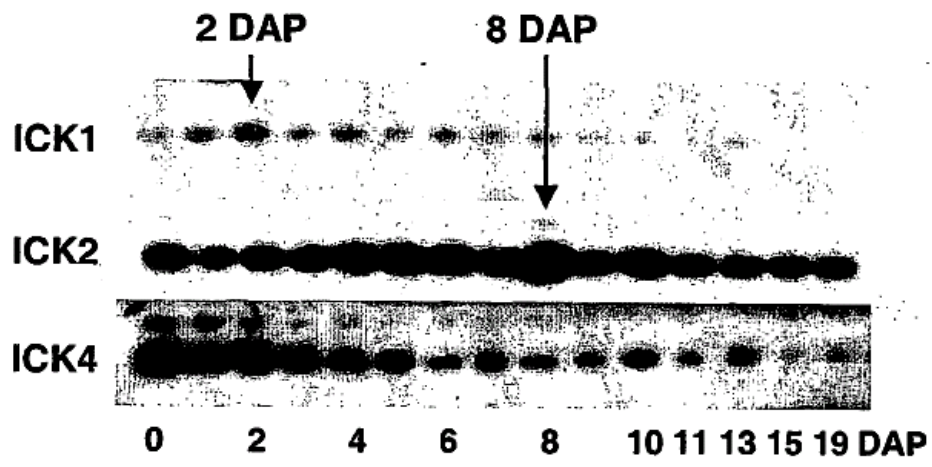
p21Cip1 - Cy-1	13 -	CGSKAC	RRL	F	GPVDS
p21Cip1 - Cy-2	150 -	FYHSKRRL	LIF	SKRKP	
p27Kip1	24 -	PKPSACRN	LFG	GPVDH	
p57Kip2	25 -	VRTSACRS	LFG	GPVDH	
Cdc25A	5 -	PSPAPRRL	LFA	CSP	P
p107	652 -	TAGSAKRRL	LFG	EDPP	
E2F1	416 -	EEGEGIRD	LE	DCDFG	
CONSENSUS			RXHF		

**FIGURA 6**

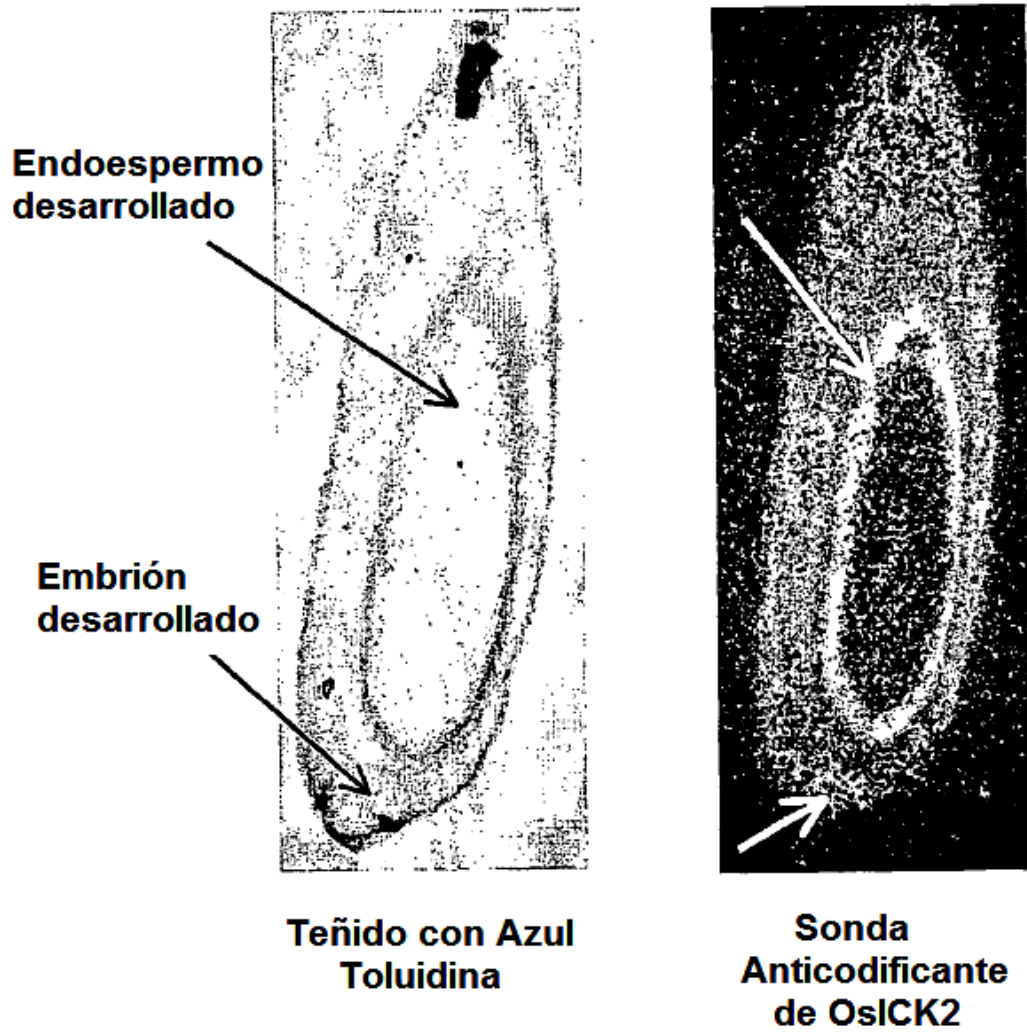


**FIGURA 7**

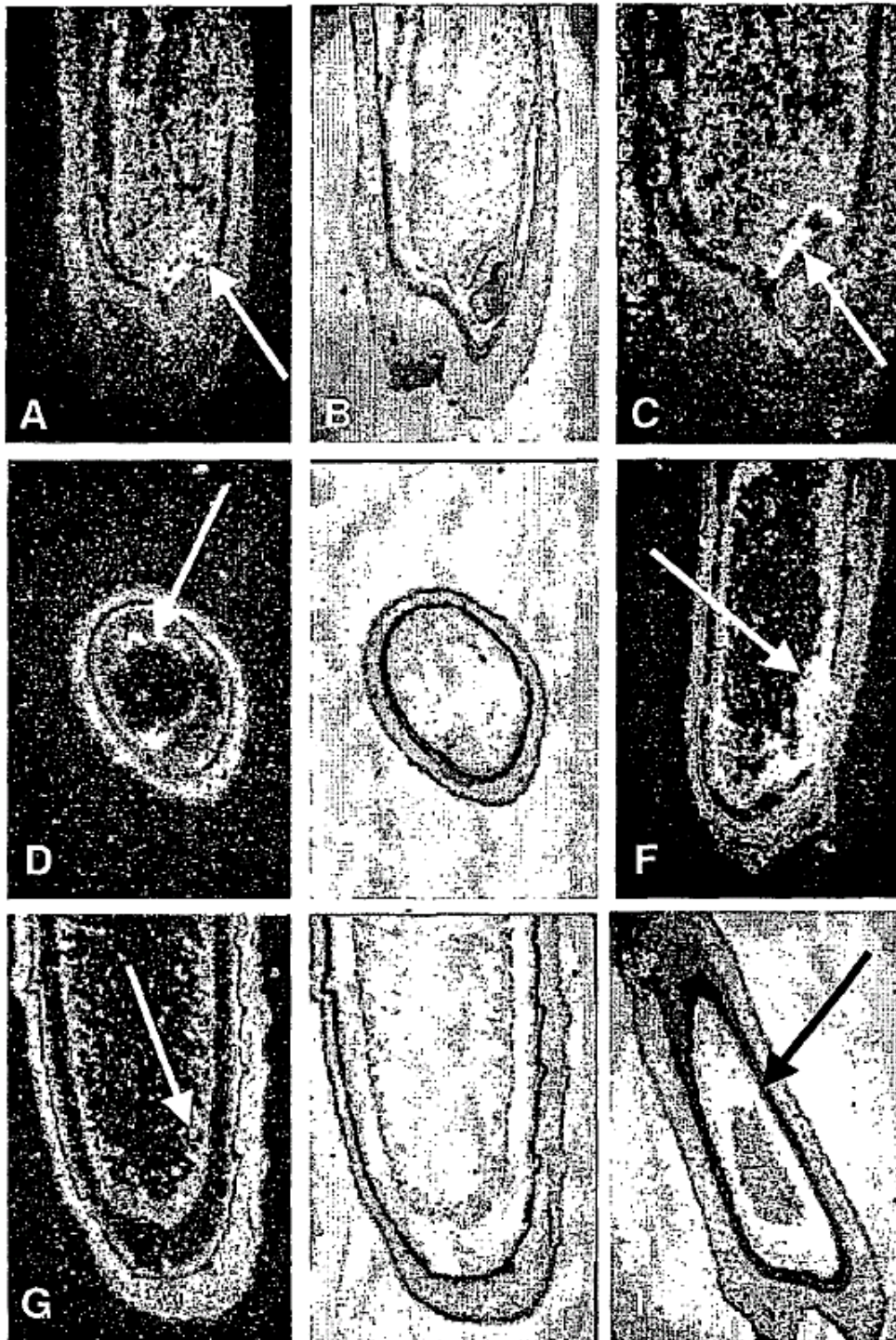




**FIGURA 8**



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

(A)

1 GAAACCTAG CCCCTCCA TCCGAGTCC CGACCGCC (ATGGGCAAGTAC  
 51 ATGCGCAAGG CCAAGGTGGT GGTCTCCGGC GAGGTGGTGG CCGCCGCCGT  
 101 CATGGAGCTC GCCGCGGCGC CGCTCGGGGT GCGCACCCGC GCCCGCTCCC  
 151 TCGCGCTGCA GAAGAGGCAG GCGGGGGAGT ACCTCGAGCT CAGGAGCCGC  
 201 AGGCTCGAGA AGCTCCCTCC TCCCCGCCG CCGCCGCCGA GGAGGAGGGC  
 251 GACGGCTGCG GCTGCGACTG CTGATGCGAC GGCACGGAG AGCGCGGAGG  
 301 CGGAGGTGTC GTTCGGGGGG GAGAACGTCC TCGAGCTGGA GGCCATGGAA  
 351 AGGAATACCA GGGAGACGAC ACCTTGCAGC TTGATCAGGG ACCCCGATAC  
 401 GATTAGCACC CCTGGATCTA CCACAAGGCG CAGCCACTCG AGTTCATT  
 451 GCAAGGTGCA AACACCCGTG CGCCACAACA TTATTCCAGC ATCAGCAGAG  
 501 CTGGAAGCGT TCTTCGCGYGC CGAAGAGCAA CCGCAACGAC AGGCTTTCAT  
 551 CGACAAGTAT AACTTTGATC CTGTGAATGA CTGCCCTCTT CCCGGCCGRT  
 601 TTGAATGGGT CAAGCTAGACTGA) TAGATTT TCAGGAAAAG AAGGGCACCA  
 651 TGGACCTCTC TGCTCCCTCC ACAGTAGTAG CGTGGCAGAG GCGCTTACCG  
 701 TCAAGTTAGC TTTGATCCTG TTGTAAAAAT TTAGGGTTAG CCTGTAGACT  
 751 CAATGGTCAA TGTGAACATA CAGAACTGAT GCTGAGTTAC AACCCATACT  
 801 CCTCAACTAC AATGTAACCE TTAACAGCTC ATTCTGTAAG GAACCACCTC  
 851 CTCCTCTAGG GCCTAGCTAG CCTTATCATC TGTATTACC AGTTGCTGGA  
 901 TTAATGAAGT TAGATCTAGA TATTGTGTCA CAGTTTAACC TGTGTGTGT  
 951 GTGGTGGTAG CATTGGCATT GGCAATGGGG TATGGCAGTG TGTGTGTGGT  
 1001 GCTGCACTGC ACCTCCCGAA GTGCTGTAAT TTTTGTCTAT ACTTCTGCTA  
 1051 AAAAAAAAA AAAAAAA

(B)

		1	50
2-H ICK4	(1)	-----	
HYB ICK4	(1)	MGKYMRKAKVVVSGEVVAAAVMELAAAPLGVRTRARSLALQKROGGEYLE	
		51	100
2-H ICK4	(1)	-----PRRRATAAATADATATESAEAEVSFGGENVLEL	
HYB ICK4	(51)	LRSRRLKELPPPPPPPPRRRRATAAATADATATESAEAEVSFGGENVLEL	
		101	150
2-H ICK4	(35)	EAMERNTRRETTPCSLIRDPTIISTPGSTTRRSRSSSHCKVQTPVRHNIIP	
HYB ICK4	(101)	EAMERNTRRETTPCSLIRDPTIISTPGSTTRRSRSSSHCKVQTPVRHNIIP	
		151	195
2-H ICK4	(85)	ASAELEAFFAAEEQRORQAFIDKYNEDEVNDCPLPGRFEWKLD-	
HYB ICK4	(151)	ASAELEAFFAAEEQRORQAFIDKYNEDEVNDCPLPGRFEWKLD-	

FIGURA 11

1- MGKYM RKAKV VVSGEVVAAA VMELAAAPLG VRTRARSLAL QKRQGGEYLE  
51- LRSRRLEKLP P P P P P P P R R R ATAAAATADA TATESAEAEV SFGGENVLEL  
101- EAMER [ LAPFV SLNCVKNTW APSPKYPRVG ATCLOGTKGV PYERDEQVLR  
151- HFW] NTRETP CSLIRDPTI STPGSTRRS HSSHECKVQT PVRHNIIPAS  
201- AELEAFFAAE EQRQRQAFID KYNFDPVND C PLPGRFEWVK LD

FIGURA 12

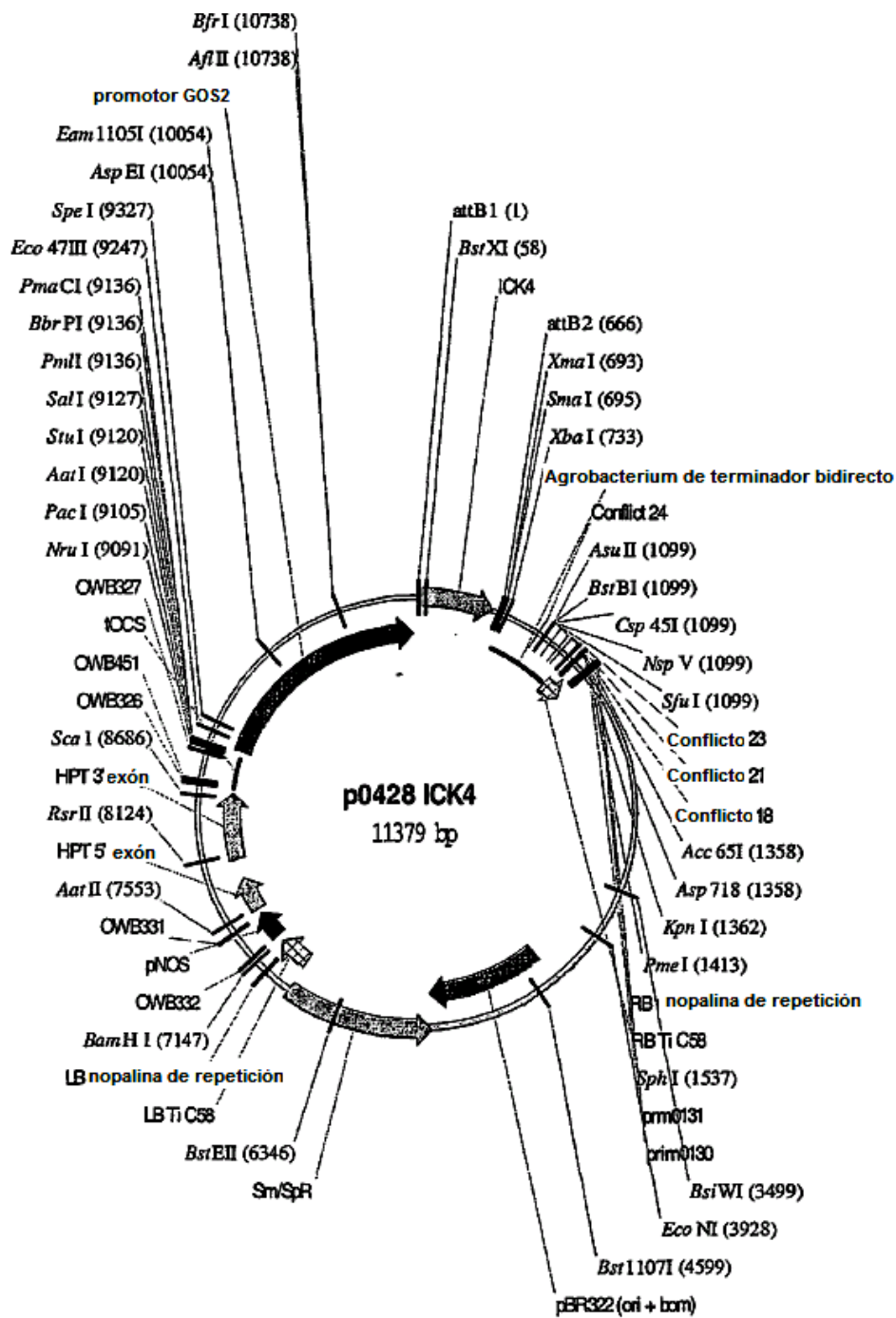


FIGURA 13

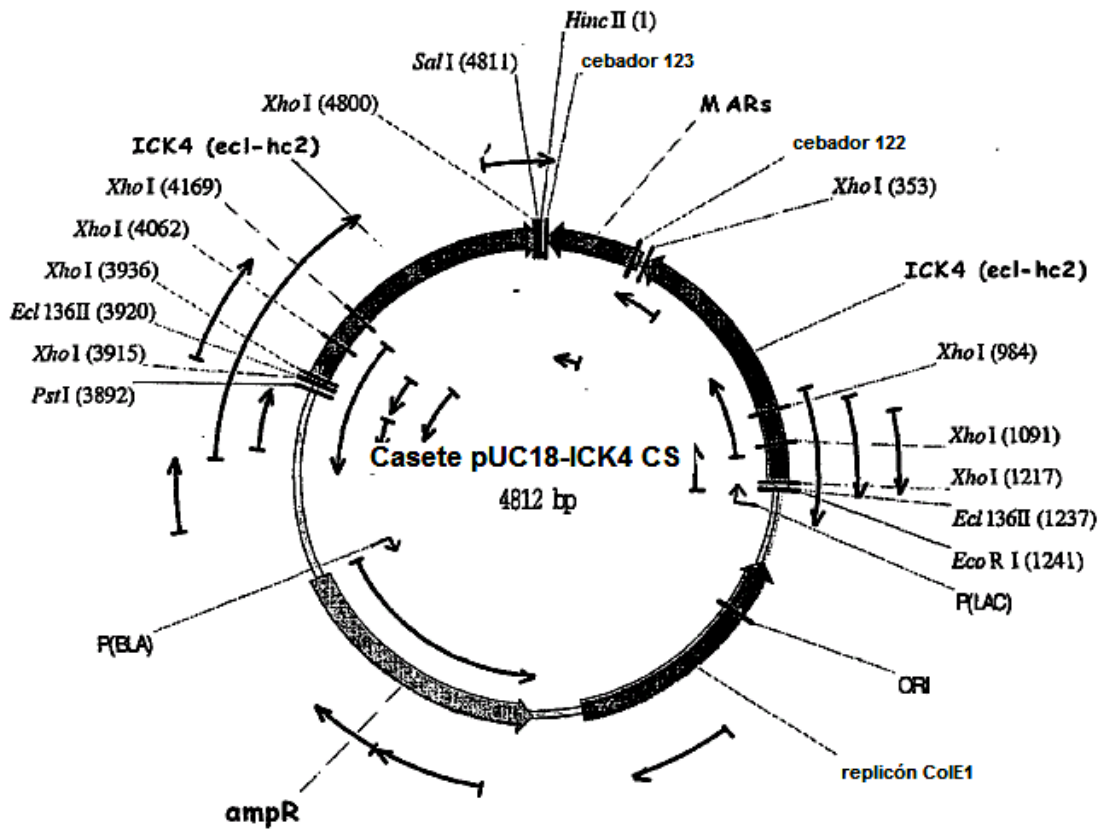


FIGURA 14

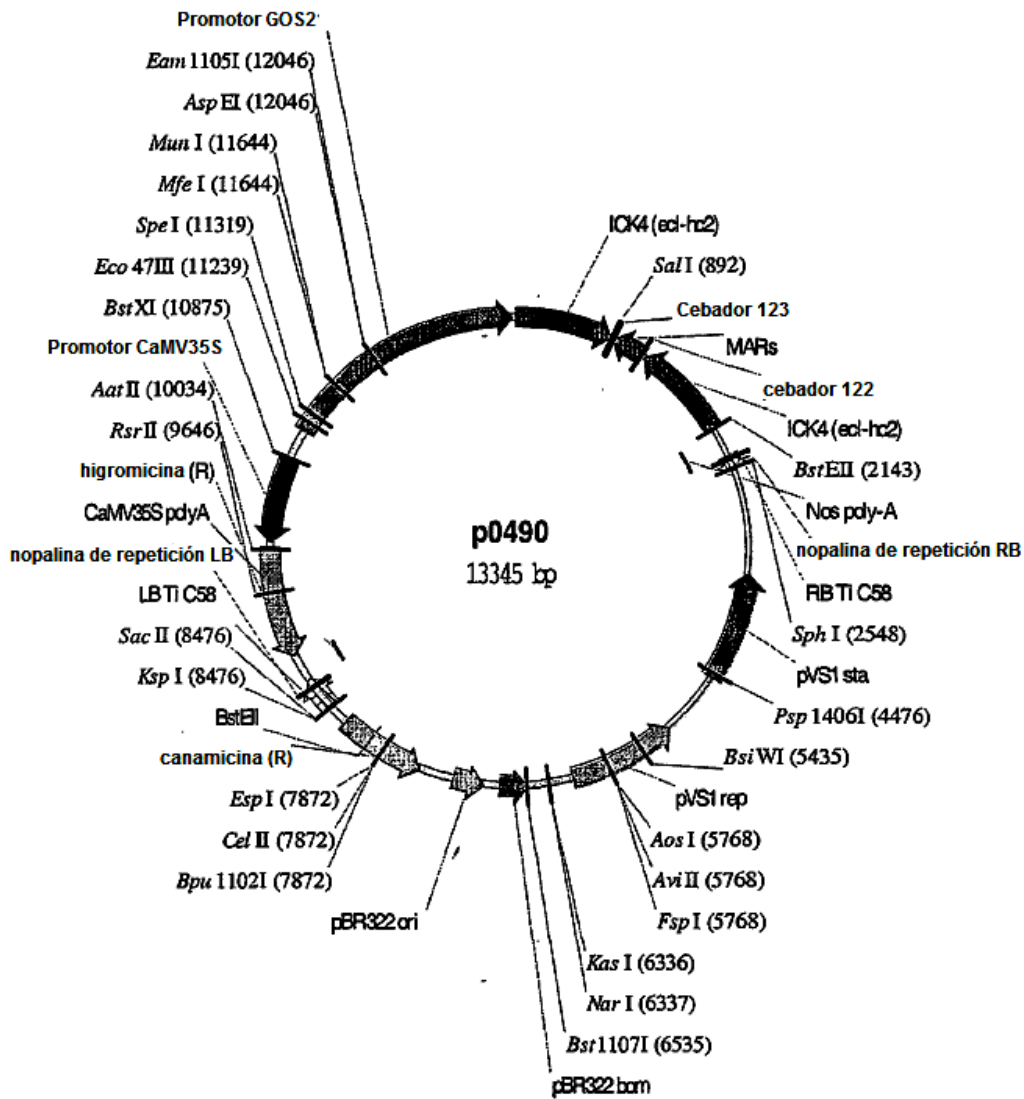


FIGURA 15



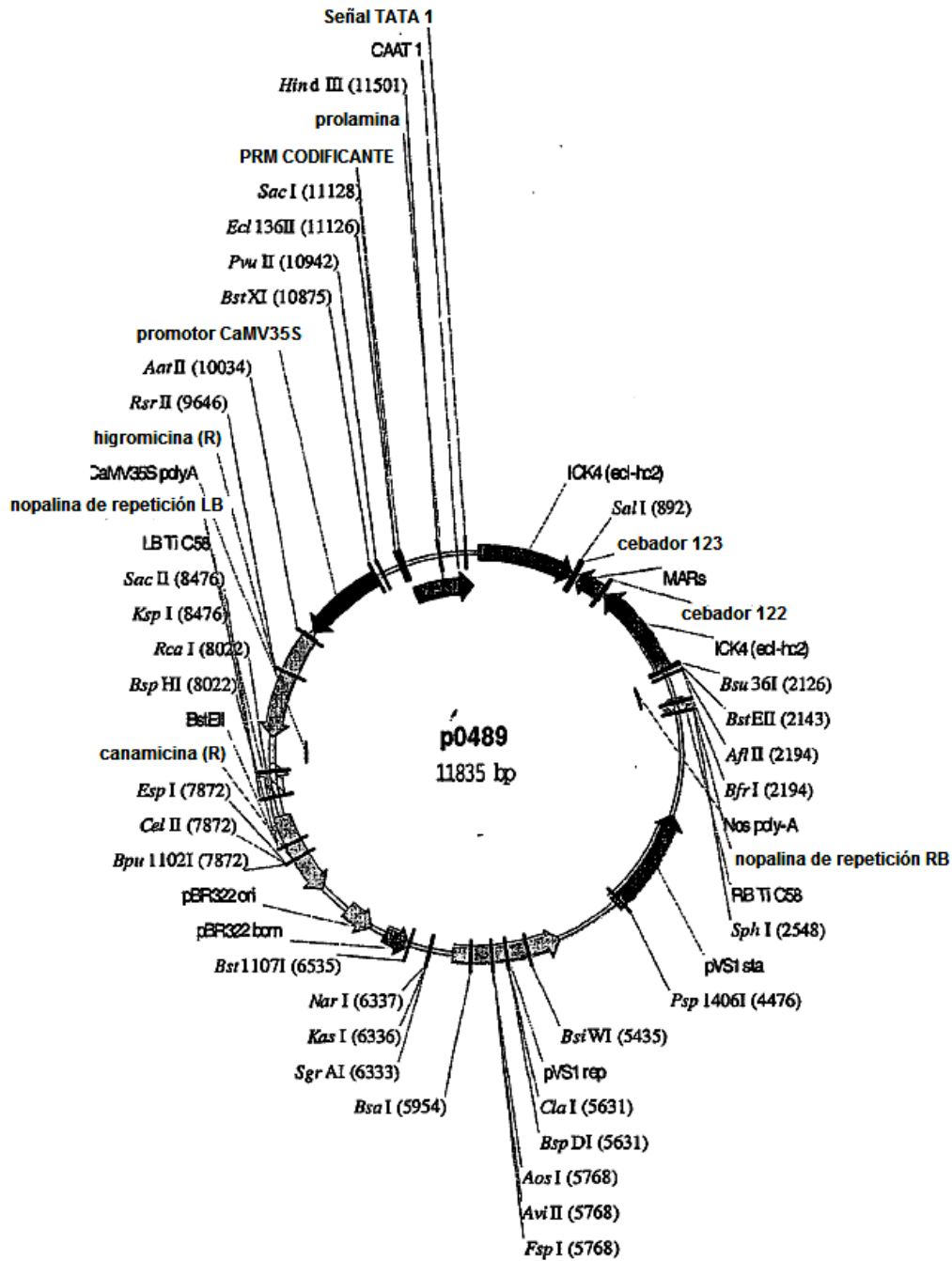


FIGURA 16

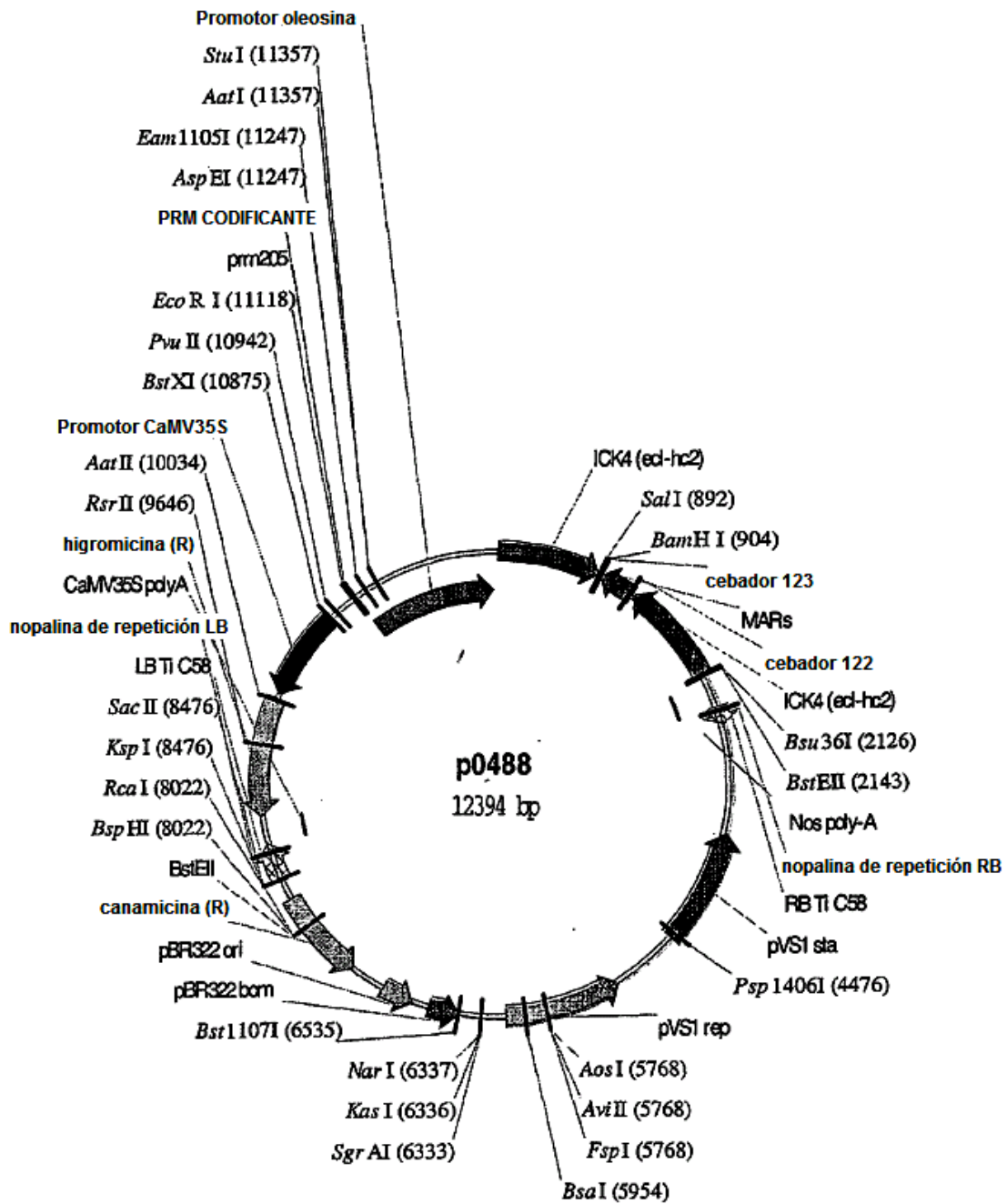


FIGURA 17

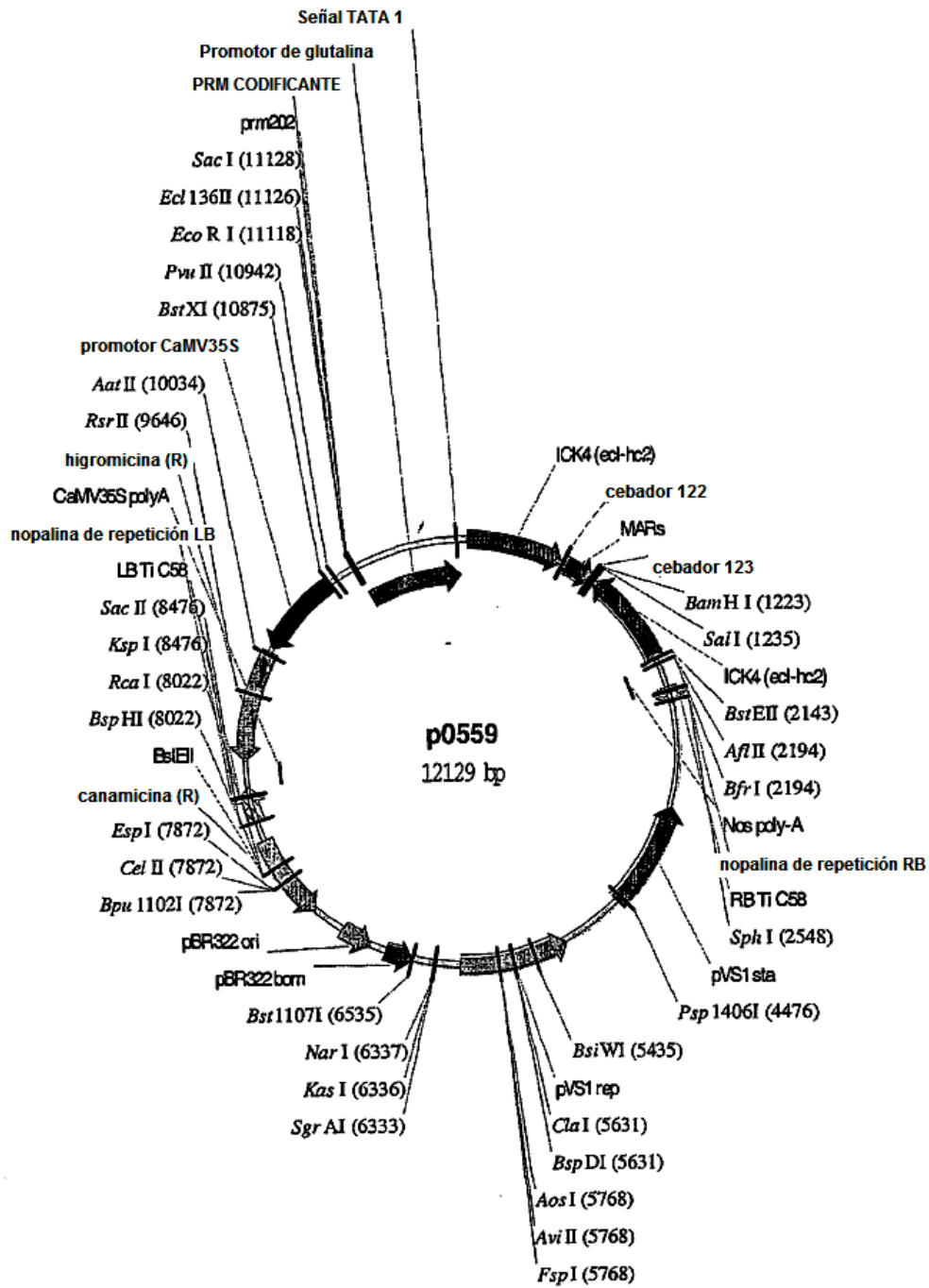


FIGURA 18

```

1 GAAACCCTAG CCCCCTCCCC TCCCGAGTCC CGACCGCCAT GGGCAAGTAC
51 ATGCGCAAGG CCAAGGTGGT GGTCTCCGGC GAGGTGGTGG CCGCCGCCGT
101 CATGGAGCTC GCCGCGGCGC CGCTCGGGGT GCGCACCCGC GCCCGCTCCC
151 TCGCGCTGCA GAAGAGGCAG GGCGGGGAGT ACCTCGAGCT CAGGAGCCGC
201 AGGCTCGAGA AGCTCCCTCC TCCCCCGCCG CCGCCGCCGA GGAGGAGGGC
251 GACGGCTGCG GCTGCGACTG CTGATGCGAC GCGGCGGAG AGCGCGGAGG
301 CGGAGGTGTC GTTCGGGGGG GAGAACGTCC TCGAGCTGGA GGCCATGGAA
351 AGGTGGGGAT TCTCTCTCTC TTCTTATTGT GCGATTCTTT TTTTGTTTTT
401 CGTGGGTTTC TTGGTTGGAT TGATTGGGGG AATCGCGTGA TTAGGGTTCA
451 GGGTTTAAGC ACCGTACGGG AGTTCCTGGG GTTCGATGTT TCTATCCGGT
501 TTTTCGCATC GGAAAATTTT GGGGATTTTT TTTCGGTGCG ATTGTGGCGC
551 TCGGAATTCC TGTGGCCAGT TTTGGGGTTT CGAAAGTATC GAAATGGAGG
601 CGAGGAATCT TTTTTTTTTT CATCACACGC GGTGTGTAAG CCCCGATGCT
651 TTCTTGGTGG GATTCTTGTC CCTTTGCTAA TTGAGACATG CAATTCGTGC
701 TTCTTGTGTT GCCTAAATTT GTTCTTTTTT CATGTTTCTT GTGGCGATAC
751 AGCCTTTTCT TTTTGCCAAAT TTCTTGTCCT TTAGCTTGTT TACAAGTTAG
801 AACCCATTTT AACTTCTTTT GAAGAAGGGA AAAAAAGAAG AAGAGAAGGT
851 GTTCCCAAGT TTTAATCCAA ATGGTTGCAA GAACCACTTC TTTGCCCCCC
901 AAATTTACCT CGAAGAATCC CCCCAAATTT GTTATTGTTT TGGATGATAA
951 AAAGGTAGGA ACTGTGCAGT AGTGCTCAAG CTCTCAACTC AAATCCCAAT
1001 TGAAACTTGA TCAATTGATT GAGCCCCCCT CTTAGTGGGG TTACTCCCAG
1051 TGGCCATGGC CTCCTGCTTT TCCTTAGTGG AAGGGAAAAG CAGCATCCTT
1101 TCCCTCCTGT TCTTTGTGTT TTGTTTGGGG GGTAGGGACC CCTCTCAATC
1151 TTTTACCAAT CAAAAGCCCT CACCTTTTGC AAGAAATTTT TCTCATAAAC
1201 ATCCTTCCCA AAGGCACCCC CCATCTCACC ACCCACCTCA AGGCCTCATT
1251 CTTGCAACTA ACTAGCCTGT CACTTCTCTG GGTCTGGAA GGGTGATGAA
1301 ATGGCATGCC TTGGTAAAAC CATCTTCTTG GGCCATGCC CCAAATTGTC
1351 ACCACCATTA AATGTTTGAG GTGAAAGGAG GGGGTCCTCC CCCTCCCCAC
1401 AAGTACTAGA AGTTGATTTG TTGGTGATCT TTGGTTCAAG CTAGGGGGAT
1451 GGAAGAACAT TTTAGGATCA GCTAGCTAGG CTACTACTAC TACTACTTGC
1501 TTCTGCAGTT CTTGGCAGGA TAATATTTTT AGCTACTACT ACTGTATCTC
1551 ACAAGCTAGC AAACGTTCTT GGTCTAGCA CTATCTTG TG GAGGTGGGGG
1601 ATCTTCTCA GCCTAAACAG GTCAAAGACC CTATTTTGCT GCGGTGTCCT
1651 TTGGTGTAGG ATAGCTCCAT TTGTTAGCTT GAATTGTGTG AAAAATACAT
1701 GGGTTGCACC ATCACCGAAG TACCAAGAG TGGGGGCAAC TTGCTTGCAA
1751 GGGACAAAGG GCGTGCCGTA TGAGAGAGAT GAGCAAGTGC TCGGTCATTT
1801 TTGGTTTGTC ATCTTGGGTG CAAGATCAAG CAGCAGGTGT CACAGGACTC
1851 ACCACAGCTT GGGCTGTCCT TGGTGCCCCA TGTCCAAGGG TGCATTCATT
1901 GCACCTCCTC TAGCCATGGC CTAATGGTGC ATACTTCTGT GCCTCAAGGA
1951 CTGTTGTCTT TGAACCATTG ATGGATATCT ATCTGCATCC ATTTGTTTTA
2001 ATCCTTGAA GCACCATGCG TGGCCTAAAT AGTGTGATCT GAACAGTGAG
2051 CATCTAAGCT AGCCATGGCC CTCCAAGCA TTTGCCATGG TGAAGCTGC
2101 AGTGCAGAGT CAGCATGTGG TGTTGTGCT GGGCCACTGT TGGTGACCGT
2151 CCTACCACCT TTTGCATGCA GCAGCAGCCA GCAGCAGCTT CGGATGCCGG
2201 TGCTTGGGTC TCTAGGATGG AGTTATGGCC GGGGGGATCA CCTCACCTGA

```

FIGURA 19

2251 GCTAGTCATG TGATTCAGAT ATGGGAGCTC CTTAGACCAA ACCATTTTCT  
 2301 TGTTTCACTT GGCCTTGTGT TTGGTTGTCC CCTAGCCTTT TTTTGGCATG  
 2351 TGAGATAAAC ATTCAGAGGT GGAACATGGT TTATTTTGCA GGACCACGGC  
 2401 GATGCTGATT TTTTTTCTCA ATATTACCGG TGCATTTTTTC TTGTTTAGTT  
 2451 TTTGGTACAA AAGAAAAAAA AGCTTACGTT GCATGTTCTG TTTTAAATTT  
 2501 GTATGCTTTT GTTTCCTGCA GGAATACCAG GGAGACGACA CCTTGCAGCT  
 2551 TGATCAGGGA CCCCAGATACG ATTAGCACCC CTGGATCTAC CACAAGGCGC  
 2601 AGCCACTCGA GTTCTCATTG CAAGGTGCAA ACACCCGTGC GCCACAACAT  
 2651 TATTCCAGCA TCAGCAGAGC TGGGAAGCGTT CTTGCTGCC GAAGAGCAAC  
 2701 GGCAACGACA GGCTTTCATC GACAAGTACG ATCTTGCTTT GCTCTTCTAT  
 2751 TATGTTCACT AAATATATCC CTGGATGCAT TGTGATAATG TCCATGGCCT  
 2801 TGCAACTTAG AAATACTATA ATGGTGTATT ATCGCTGACT GACAATTTAA  
 2851 CTTCTTTGTC GTAATCTTCA GGTATAACTT TGATCCTGTG AATGACTGCC  
 2901 CTCTTCCCGG CCGGTTTGAA TGGGTCAAGC TAGACTGATA GATTTTCAGG  
 2951 AAAAGAAGGG CACCATGGAC CTCTCTGCTC CCTCCACAGT AGTAGCGTGG  
 3001 CAGAGGCGCT TACCGTCAAG TTAGCTTTGA TCCTGTTGTA AAAATTTAGG  
 3051 GTTAGCCTGT AGACTCAATG GTCAATGTGA ACATACAGAA CTGATGCTGA  
 3101 GTTACAACCC TAATCCCTCA ACTACAATGT AACCCTTAAC AGCTCATTCT  
 3151 GTAAGGAACC ACCTCCTCCT CTAGGGCCTA GCTAGCCTTA TCATCTGTTA  
 3201 TTACCAGTTG CTGGATTAAT GAAGTTAGAT CTAGATATTG TGTCACAGTT  
 3251 TAACCTGTTT TGTGTGTGGT GGTAGCATTG GCATTGGCAA TGGGGTATGG  
 3301 CAGTGTGTGT GTGGTGCTGC ACTGCACCTC CCGAAGTGCT GTAATTTTTG  
 3351 TCTATACTTC TGCT

FIGURA 19 (cont.)

```

1      ATGGGGAAGA AGAAGAAGCG CGACGGCGCG GCGGCGAGGA GGCAGGCGCG
51     GGTGGTGGTC GGCGGCGTCC GTACGCGGGC CGCCGTCACG GCGAGGAGGG
101    TGGTGGCGAG CGCGGAGGAG GGTGTGGTT TGGTGGGCCG TGGCGGTGGC
151    GGTGGCAGTG GCGGAGACGA TGGCGAGGGC GGATGCTATC TCGCTCTGCG
201    GAGCAGGAGG CTGCCCTTCG TGGCGGCCGC GGTGGTGTCTG TCGCGGAGGG
251    AGGAGGCGCT CGGTGATTCG GTGGCGGAGG CGGCTTCGTC GTCGTCGTCG
301    CGGGCGGTGG AATTGTTGGG CTGTTCTGGT GAGGAGGAGG CTATGGCCGA
351    GAAGGTGATT GATGAGCCCT AGAATTCCTC CGCGGCTCGA GTGCTCGATC
401    GCCCGCTTCC ATCTCTTGCT GAATGATGCG GCTTGGGATG TGGTGGTTTT
451    GCAGGTTTTG ACGCAGGCAG GCGAGGATCA CGACGAGGAG AGCTCCGTCG
501    GCGACTCCGG CTGCGGCCGC GAGAGGTGAT CGAGCTCCTC TCCACGCGTT
551    CTTGCTTGTC CTTGACATGA TTAATTACAA CCGCCGTTCT CTCAATTGAA
601    TTATCGCAAT TCAATCCAGG AGCGCGACGA CGCCGTCGAG CCGCCGGCCG
651    CCGGGAGACG CGGACTCGAG CGACGCGGAG TCAAACCAGG AGGCCAAGCA
701    GCAAATGTGC CGCCGGAGTT CGACGACCTC AGCAGCTGCA TTTCACGCGG
751    GAGCGACGAC GAGGAGCTTC AGGATGATGG CACCGCCGGC GCGGCGGCCA
801    GAGATCGAGG AGTTCCTCGC CGCTGCGGAG AGGTCCGAGG CCGAGCGCTT
851    CGCCGCCAAG TGAGTGCTGC ATCACATATT GTCGTCCGTG CGTCGTGTCTG
901    TACATATCGT CGTCGTCGTC AAAATCGGCC TCGATCGCGA CATGCATGGC
951    CGCATGGGAG CTGATTAACG TCGCTCCTC CTCCTCAGGT ACAACTTCGA
1001   CGTGGTGC GC GCGTGCCG TCGACGCCG CCGCGCCGGG CGGTTTCAAT
1051   GGACCGCGGT GGCAGCGGC TGA

```

FIGURA 20

**A.**

```

1  ATCGGGAAGA AGAAGAAGCG CGACGGCGCG GCGGCGAGGA GGCAGGCGCG
51  GGTGGTGGTC GCGGGCGTCC GTACGCGGGC CGCCGTCACG GCGAGGAGGG
101 TGGTGGCGAG CGCGGAGGAG GGTGTGGT TGGTGGGCCG TGGCGGTGGC
151 GGTGGCAGTG GCGGAGACGA TGGCGAGGGC GGATGCTATC TCGCTCTGCG
201 GAGCAGGAGG CTGCCCTTCG TGGCGGCCGC GGTGGTGTTCG TCGCGGAGGG
251 AGGAGGCGCT CGGTGATTTCG GTGGCGGAGG CGGCTTCGTC GTCGTCTGTCG
301 CGGGCGGTGG AATTGTTGGG CTGTTCTGGT GAGGAGGAGG CTATGGCCGA
351 GAAGNNGAGC GCGACGACGC CGTCGAGCCG CCGGCCGCCG GGAGACGCGG
401 ACTCGAGCGA CGCGGAGTCA AACCAGGAGG CCAAGCAGCA AATGTGCCGC
451 CGGAGTTCGA CGACCTCAGC AGCTGCATTT CACGCGGGAG CGACGACGAG
501 GAGCTTCAGG ATGATGGCAC CGCCGGCGGC GCGGCGAGAG ATCGAGGAGT
551 TCCTCGCCGC TCGGAGAGG TCCGAGGCCG AGCGCTTCGC CGCCAAGTAC
601 AACTTCGACG TGGTGC GCGG CGTGCCGCTC GACGCGGGCG GCGCCGGGCG
651 GTTCGAATGG ACCGCGGTGG GCAGCGGCTG A

```

**B.**

```

1  MGKKKKRDGA AARRQARVVV GGVRTAAVT ARRVVASAE GCGLVGRGGG
51  GSGGDDGEG GCYLRLRSRR LPFVAAVVS SRREEALGDS VAEAASSSSS
101 RAVELGCSG EEEAMAEEKS ATPSSRRPP GDADSSDAES NQEAQQMCR
151 RSSTTSAAAF HAGATRSFR MMAPPAAAAE IEEFLAAER SEAERFAAKY
201 NFDVVRGVPL DAGGAGRFEW TAVGSG

```

FIGURA 21