



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 925**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01968216 .0**

96 Fecha de presentación : **27.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1349946**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2003**

54

Título: **Polinucleótidos de plantas que codifican prenil proteasas.**

30

Prioridad: **25.08.2000 US 227794 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.06.2011**

73

Titular/es: **BASF Plant Science GmbH  
67056 Ludwigshafen, DE**

72

Inventor/es: **Mittendorf, Volker;  
Henkes, Stefan;  
Da Costa e Silva, Oswaldo;  
Haertel, Heiko;  
Sarría-Millan, Rodrigo;  
Chen, Ruoying y  
Allen, Damian**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 925 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

Polinucleótidos de plantas que codifican prenil proteasas

Campo de la Invención

5 La presente invención proporciona polinucleótidos novedosos que codifican polipéptidos de prenil proteasas, y homólogos de los mismos. También se proporcionan vectores y casetes de expresión, células vegetales que contienen estos, plantas que comprenden dichas células vegetales y métodos recombinantes para producir dichas plantas. La divulgación se relaciona adicionalmente con métodos para aplicar estos novedosos polipéptidos de plantas a la identificación, prevención y/o conformamiento de resistencia a diversas enfermedades y/o trastornos de plantas, particularmente resistencia a la sequía, y/o para manipular la cantidad de compuestos almacenados en semillas, particularmente aceites, azúcares y proteínas.

Antecedentes de la Invención

15 La sequía es uno de los factores más limitantes en el crecimiento y productividad de las plantas. Los cultivos y los rendimientos pierden debido a la sequedad en cultivos tales como soja, maíz, arroz y algodón que representa un factor económico significativo. Adicionalmente, la sequedad también es responsable de escasez de alimentos en muchos países en el mundo. Desarrollar cultivos tolerantes a la sequedad es una estrategia que tiene potencial para aliviar algunas de estas situaciones adversas.

20 Las estrategias de cruce tradicional de plantas para desarrollar nuevas líneas de plantas que exhiban tolerancia a la sequedad son relativamente lentas y requieren líneas tolerantes específicas para entrecruzar con las líneas comerciales deseadas. Los recursos de germoplasma limitados para tolerancia a la sequedad en compatibilidad en cruces entre especies de plantas relacionadas de forma distante representan por lo tanto problemas significativos encontrados en los cruces convencionales. En contraste, la transformación genética de las plantas y la disponibilidad de genes útiles sometidos a patrones de expresión específicos permiten generar plantas tolerantes a la sequedad utilizando métodos transgénicos.

25 Las plantas están expuestas durante su ciclo de vida total a condiciones de contenido de agua ambiental reducido. La mayoría de las plantas han desarrollado estrategias para protegerse a sí mismas contra estas condiciones de desecación. Sin embargo, si la severidad o duración de las condiciones de sequía son extensas, los efectos sobre el desarrollo de las plantas, crecimiento y rendimiento de la mayor parte de los cultivos son profundos.

30 La fisiología de una planta tensionada por sequía se altera dramáticamente en comparación con una planta que crece bajo condiciones normales. La mayor parte de los cambios y sus causas aun no están caracterizados. El ácido abscísico (ABA) juega un papel central en la mediación de los procesos entre la percepción de la desecación y los cambios celulares. El ABA se incrementa fácilmente al aparecer la desecación de las células. Este incremento produce el cierre de los estomas, disminuyendo por lo tanto la pérdida de agua a través de la transpiración.

Los lípidos almacenados en las semillas se sintetizan a partir de precursores derivados de carbohidratos.

35 Las plantas tienen efecto una ruta glicolítica completa en el citosol (Plaxton 1996, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 185-214) y se ha demostrado que existe también una ruta completa en los plástidos de semillas de colza (Kang & Rawsthorne 1994, Plant J. 6 : 795-805). La sacarosa es la fuente primaria de carbono y energía, transportada desde las hojas hacia las semillas en desarrollo. Durante la fase de almacenamiento de las semillas la sacarosa se convierte en citosol para proveer los precursores metabólicos glucosa-6-fosfato y piruvato. Estos se transportan hacia los plástidos y se convierten en acetil-CoA que sirve como precursor primario para la síntesis de ácidos grasos. Aunque varios ácidos nucleicos que están involucrados en las etapas enzimáticas del metabolismo de los lípidos, ácidos grasos y almidón han sido clonados e identificados, hay probablemente una multitud de tales ácidos nucleicos vegetales que no han sido identificados aun. El análisis fenotípico de diversas plantas oleaginosas y otras plantas mutadas ha revelado otras proteínas putativas involucradas en el metabolismo de los lípidos vegetales, pero la técnica anterior aun tiene que describir la localización genómica de estas proteínas o la secuencia de los ácidos nucleicos que las codifican.

45 La regulación de la fosforilación de las proteínas por quinasas y fosfatasa se acepta como un mecanismo universal de control celular (Cohen 1992, Trends Biochem. Sci. 17: 408-413), y de Ca<sup>2+</sup> y las señales de calmodulina son transducidas frecuentemente a través de Ca<sup>2+</sup> y quinasas y fosfatasa dependientes de calmodulina (Roberts & Harmon 1992, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 375-414.). El ácido okadáico, un inhibidor de proteína fosfatasa, ha mostrado afectar ambas rutas del ácido giberélico (GA) y ácido abscísico (ABA) (Kuo et al. 1996, Plant Cell. 8: 259-269). Aunque las bases moleculares están involucradas en todos los procesos regulatorios en el desarrollo de las semillas (por ejemplo Ritchie & Gilroy 1998, Plant Physiol. 116: 765-776; Arenas-Huertero et al. 2000, Genes Dev. 14: 2085-2096). De la misma forma, las hormonas etilénicas de plantas (por ejemplo Zhou et al.

1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10294-10299; Beaudoin et al. 2000, Plant Cell 2000: 1103-1115) y la auxina (por ejemplo Colon- Carmona et al. 2000, Plant Physiol. 124: 1728-1738) están involucradas en el control del desarrollo de las plantas también.

5 La farnesilación de las proteínas, la adición de un terminal C, una cadena de 15 carbonos a proteínas y subsecuente procesamiento, se han identificado como cruciales para el papel de mediación del ABA en la cadena de transducción de la señas de desecación (1). En resumen, se requiere la farnesilación de las proteínas para el cierre de los estomas inducido por el ABA, así como para el control de la pérdida de agua.

10 La farnesilación de las proteínas es una reacción enzimática en tres etapas como se muestra en la Figura 1. El fenotipo tolerante a la sequedad del mutante eral de Arabidopsis se debe a una mutación nula en la subunidad beta de la enzima farnesil transferasa (FTasa), la primer enzima en la ruta de la farnesilación de las proteínas.

15 Actualmente, las secuencias correspondientes a los clones de otras enzimas involucradas en la farnesilación de la proteína, ha saber, prenil proteasa (PrPasa) y metilasa no han sido descritas en la literatura sobre vegetales. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica para identificar genes vegetales que codifiquen estas enzimas de farnesilación de proteínas como otra oportunidad para generar plantas tolerantes a condiciones de secantes (por ejemplo, sequía).

#### Breve Resumen de la Invención

La presente invención proporciona novedosos polinucleótidos que codifican polipéptidos de prenil peptidasa.

La presente divulgación describe adicionalmente un método general para manipular plantas tolerantes a la sequedad. Dicho método es en general aplicable a todas las plantas.

20 Se divulga adicionalmente el promotor del gen Arabidopsis FTasa. Este promotor se expresa lo más fuertemente en células guardiánes, esto es, un promotor específico de una célula guardián.

Otro aspecto de la divulgación proporciona vectores de expresión en levaduras utilizados para producir grandes cantidades de la Arabidopsis PrPasa en levadura.

25 Se describen adicionalmente en esta divulgación vectores de transformación utilizados para transformar plantas de Arabidopsis, colza, soja y maíz.

30 Adicionalmente, la divulgación proporciona métodos para aplicar los polinucleótidos y polipéptidos de la invención para crear plantas transgénicas con comportamientos deseables, los cuales incluyen, pero no se limitan, a una defensa potenciada de las plantas, tolerancia a la sequedad, tolerancia a la sal, tolerancia al ultravioleta (UV), desarrollo potenciado de flores, síntesis de terpenos y formación incrementada de compuestos de almacenamiento en semillas, tales como aceites, azúcares y proteínas.

35 Se divulga adicionalmente el promotor del gen Arabidopsis USP. Este promotor se expresa de la forma más fuerte durante las etapas de desarrollo de las semillas, esto es, un promotor específico de las semillas. La divulgación proporciona anticuerpos, específicos para polipéptidos de la presente invención. Adicionalmente, la divulgación proporciona métodos para utilizar anticuerpos de la presente invención para modular el fenotipo de las plantas, tanto funcional como morfológicamente.

Finalmente, la divulgación proporciona métodos para refinar más particularmente la función de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente invención.

La presente divulgación satisface una necesidad en la técnica, en parte, proveyendo las secuencias aisladas de polinucleótidos y polipéptidos de cinco PrPasas derivadas de plantas.

40 Ha saber, describimos las secuencias de PrPasa de musgo (*Physcomitrella patens*), dos secuencias de PrPasa de Arabidopsis Thaliana, una PrPasa de sojas (*Glicine max*) y una PrPasa de maíz (*Zea mays*).

45 Adicionalmente, la presente divulgación proporciona los primeros resultados que sugieren que las cantidades reducidas de ARNm PrPasa (esto es expresión genética reducida de PrPasa) en una planta de Arabidopsis se relaciona directamente con la tolerancia a la sequedad inducida en comparación con plantas de control no transformadas. La presente invención también describe métodos para manipular cepas de plantas de colza, soja y maíz tolerantes a la sequedad generadas a través de expresión disminuida de PrPasa. La conservación de la actividad de la PrPasa en los eucariotes que varían desde los humanos hasta las plantas inferiores sugiere fuertemente que la enzima PrPasa es un enzima esencial y esta presente en todas las eucariotes. Por lo tanto, el

método descrito para manipular las plantas tolerantes a la sequedad sería en general aplicable a todas las plantas. La ORF previamente descrita de la PrPasa de la Arabidopsis (AF007269 (número de accesos GenBank, gen="AIG002N01. 21) de 24979 a 28076) fue predicha por el programa de ordenador (Genefinder (P. Green and L. Hillier, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))), y fue depositado en la base de datos de GenBank. No refleja el ORF real para este gen como se muestra en la Figura 13. Esto demuestra claramente que ambas AtPrPase1-2 son secuencias novedosas.

La farnesilación de chaperones vegetales ha sido implicada positivamente en la función biológica de estas proteínas en respuesta al estrés. La sobreexpresión de las rutas de farnesilación da como resultado una tolerancia incrementada al calor, la sequedad y el estrés por sal. Además, la farnesilación de las proteínas también está involucrada en la regulación positiva del control de ciclo celular. Un incremento de la farnesilación de la proteína da como resultado una proliferación incrementada de las células, llevando al final tanto a un crecimiento incrementado como a una acumulación incrementada de los compuestos de almacenamiento en las semillas.

Adicionalmente, la presente invención proporciona novedosos polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la PrPasa vegetal y homólogos de los mismos. También se proporcionan vectores y casetes de expresión, células vegetales que contienen los mismos y plantas que comprenden dichas células vegetales. Se proporcionan adicionalmente métodos para producir plantas transgénicas que contienen una prenil proteasa que codifica un ácido nucleico como se define en las reivindicaciones con tolerancia incrementada a una tensión ambiental en comparación con una variedad silvestre de la planta. La divulgación se relaciona adicionalmente con métodos para aplicar estos novedosos polipéptidos vegetales a la identificación, prevención y/o conformación de la resistencia a diversas enfermedades y/o trastornos de plantas, y/o al incremento en la cantidad de compuestos almacenados en las semillas.

#### Breve Descripción de las Figuras/Dibujos

La Figura 1 representación esquemática de la ruta de farnesilación de proteínas. Esta figura identifica las enzimas conocidas involucradas en la ruta de farnesilación de las proteínas, además de su relación funcional. Para propósitos de ilustración, se representa una proteína objetivo prospectiva mediante una línea punteada; mientras que la línea sólida representa la cadena de 15 átomos de carbono añadida al termino C de la proteína objetivo en el sitio "CaaX". La cadena de 15 carbonos se adiciona a una cisteína (C) conservada por la enzima farnesil transferasa (Ftsa). Los últimos tres residuos de aminoácidos (aaX) son escindidos por la enzima prenil peptidasa (PrPasa). Finalmente, la cisteína modificada es metilada mediante una metilasa para crear el producto activo final de la ruta de farnesilación de la proteína.

La Figura 2 muestra la secuencia de polinucleótidos de la PrPasa parcial a partir de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 1) (Clon ID No: PpPrPase1). La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 1398 nucleótidos.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2).

La secuencia de polipéptidos contiene una secuencia de 394 aminoácidos. La abreviatura estándar de una letra para los aminoácidos se utiliza para ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida.

Figura 4 secuencia de nucleótidos de la PrPasa de longitud completa (ArPrPase1) de *Arabidopsis Thaliana* ( SEQ ID NO: 3) (Clon ID No: AtPrPase1). La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 1275 nucleótidos.

Figura 5 secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO: 4). La secuencia de polipéptidos contiene una secuencia de 424 aminoácidos. Se utiliza la abreviatura estándar de una letra para los aminoácidos con el fin de ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida.

Figura 6 secuencia de nucleótidos de una PrPasa de longitud completa (AtPrPase2) de *Arabidopsis Thaliana*(SEQ ID NO:5) (Clon ID No: AtPrPase2). La secuencia de aminoácidos contiene una secuencia de 1275 nucleótidos. SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5son AtPrPasas de *Arabidopsis* de longitud completa con 8 diferencias en nucleótidos en las posiciones de nucleótidos: 276,504,1046,1062,1068,1141,1182, y 1190.

Figura 7 secuencia deducida de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 ( SEQ ID NO: 6). La secuencia de polipéptidos contiene una secuencia de 424 aminoácidos. Se usa la abreviatura estándar de una letra para aminoácidos con el fin de ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida.

SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 son AtPrPasas de *Arabidopsis* de longitud completa con tres diferencias en aminoácidos en la posiciones de aminoácidos: 349, 381 y 397.

- Figura 8 secuencia de nucleótidos de la PrPasa (GmPrPasa1 de longitud completa) de sojas ( SEQ ID NO:7) (Clon ID No: GmPrPase1) de la presente invención. La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 1434 nucleótidos.
- 5 Figura 9 secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID NO: 7 (SEQ ID NO: 8). La secuencia de polipéptidos contiene una secuencia de 400 aminoácidos. Se usa la abreviatura estándar de una letra para los aminoácidos con el fin de ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida.
- Figura 10 secuencia de nucleótidos de una PrPasa parcial de maíz (ZmPrPasa1) (SEQ ID NO: 9). (Clon ID No: ZmPrPasa1). La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 1301 nucleótidos.
- 10 Figura 11 secuencia deducida de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO:10). La secuencia de polipéptidos contiene una secuencia de 329 aminoácidos. Se uso la abreviatura estándar de una letra para los aminoácidos con el fin de ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida.
- Figuras 12A D alineamiento de secuencias múltiples de aminoácidos (algoritmo CLUSTAL W, matriz de marcación blosum62) de SEQ ID NO: 2,4,6,8,10 y secuencias de la PrPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (acceso Swiss-Prot #P47154) y PrPasa humana (acceso Swiss-Prot #075844). El sitio activo esta sombreado.
- 15 Figura 13 comparación de la estructura Exón/Intron de la (SEQ ID NO:4 y 6) ORF de las PrPasas de *Arabidopsis* predichas por ordenador (Genefinder (P. Green and L. Hillier, www. ncbi. nlm. nih. gov)) y demostrados experimentalmente. Los exones están numerados secuencialmente en ambos clones. Los exones correspondientes están colocados uno debajo de otro. Las líneas que conectan los intrones no tienen significado biológico. Las rupturas fueron introducidas en las secuencias para realizar esta Figura.
- 20 Figura 14 diagrama de los vectores de expresión en plantas pBPSRC003, pBPSRC005 y pBPSGB01 que contienen diferentes promotores de plantas que controlan la expresión del gen antisentido PrPasa de *Arabidopsis*. En pBPSRC003 la expresión del gen antisentido PrPasa está bajo control del superpromotor constitutivo (Ni et al., *The Plant Journal* 7: 661-76 (1995)). Mientras que en pBPSRC005, un promotor específico de células guardianes KST1 (G. Plesch et al, resultados no publicados) y en pBPSGB01 un promotor específico de semillas USP (proteína de semilla desconocida, Baumlein et al., *Mol Gen Genet* 225: 459-467, 1991) conduce la expresión del mismo gen. Los componentes son: gen de resistencia de la gentamicina aacCl (Hajdukiewicz et al., 1994 *Plant Molecular Biology* 25: 989-94), promotor de NOS (Becker et al., 1992 *Plant Molecular Biology* 20: 1195-7), terminador g7T (Becker et al., 1992), terminador NOSpA (Jefferson et al., *EMBO J* 6: 3901-7 1987) y nptII (neomicina fosfotransferasa II) gen de resistencia a la kanamicina, promotor de actina AtAct2-i, octopina sintasa OCS3 (MacDonald et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 5575-5581), promotor USP específico para semillas, terminador NOSpA (Jefferson et al., *EMBO J* 6: 3901-7 1987).
- 25 30 Las Figuras 15 A y B secuencia de nucleótidos de un promotor AtPrPasa1 de *Arabidopsis* (promotor/AtPrPasa1) SEQ ID NO: 11 (Clon ID No: promotor/AtPrPasa1).
- 35 La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 2047 nucleótidos.
- Figura 16 comparación de secuencia de aminoácidos (fastata: alineamiento por pares, matriz de marcación blosum62, penalidad para apertura de brecha: 10, penalidad por extensión de brecha: 0.1) de los polipéptidos PrPasa (SEQ ID NO: 2,4,6,8,10) con la PrPasa de levadura (acceso a Swiss-Prot # P47154) y PrPasa humana (acceso a Swiss-Prot 075844). Los valores de identidad porcentual y similaridad porcentual se muestran en paréntesis.
- 40

#### Descripción Detallada de la Invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los ejemplos incluidos en las mismas.

- 45 Un aspecto de esta invención es pertinente a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos de la enzimas PrPasa de sojas. Otros fragmentos de ácidos nucleicos de otros organismos pueden aislarse utilizando los fragmentos de ácidos nucleicos descritos como sondas en experimentos de hibridización.

- 50 Un aspecto de esta invención describe el principio de utilizar la reducción de la actividad del gen de PrPasa para manipular plantas tolerantes a la sequedad. Esta estrategia ha sido demostrada para la *Arabidopsis Thaliana*, colza, sojas y maíz pero su aplicación no está restringida a estas plantas. La única condición para realizar esto es el aislamiento de los correspondientes genes PrPasa de las plantas objetivo.

La reducción en PrPasa puede lograrse mediante, pero no limitándose, uno de los siguientes ejemplos: (a) represión de la expresión del gen antisentido, (b) anticuerpos objetivo para la PrPasa, y (c) represión del promotor manipulado objetivo con por ejemplo factores de transcripción derivados de un dedo de zinc.

5 En otro aspecto de esta divulgación, se describe el promotor de una PrPasa de Arabidopsis. Este promotor es específico para células guardián y puede utilizarse para manipular efectos tales como la tolerancia a la sequedad y regulación del intercambio de gases en la planta.

La presente invención puede tener una contribución significativa a la técnica proveyendo nuevas estrategias para manipular o para diseñar mejor la tolerancia a la sequedad en plantas de cultivo, especialmente el uso de clones de PrPasa previamente conocidos de origen vegetal.

10 Esto se logra reduciendo la expresión de los genes referidos en células vegetales transformadas, preferiblemente pero no restringiéndose a células guardián.

Adicionalmente, la farnesilación del AdnJ chaperón bacteriano es esencial para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7).

15 La farnesilación de esta chaperona se requiere por su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, el ANJ1 es un homólogo de DnaJ y se induce por tratamientos con calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 The Plant Cell 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación. El incremento en la farnesilación de chaperonas vegetales ha demostrado que da como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente lleva a una tolerancia incrementada de las plantas al estrés. Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención tienen usos que incluyen conferir resistencia al calor, sequedad y estrés por sal en plantas.

20 Alternativamente, los antagonistas pueden tener usos que incluyen la modulación de la susceptibilidad de una planta a tenciones bióticas y/o abióticas las cuales incluyen, pero no se limitan a estrés por calor, sequedad y sal en plantas. Preferiblemente los antagonistas incrementan una resistencia de una planta a tensión por calor, sequedad y sal. En una realización, la sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa de la presente invención en una planta utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en células guardián, sería útil para mejorar la tolerancia a la sequedad y a la sal en una planta.

25 La farnesilación de proteínas esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 PNAS 97: 7633-8). Mutations in genes involved in protein farnesylation, namely farnesyl transferase, results in inhibition of cell proliferation in Arabidopsis plants (Bonetta et al. 2000 Planta 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de la farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación celular incrementada, incrementando el crecimiento de la planta. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de la planta, y potencialmente el rendimiento de la planta, incrementando preferiblemente el crecimiento de la planta. Además, las antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento y/o rendimiento de la planta, a través preferiblemente del incremento del crecimiento-rendimiento de la planta. La sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí) puede ser útil para incrementar el crecimiento de la planta acelerando la división celular.

30 Los polinucleótidos también pueden ser utilizados para expresar proteínas recombinantes para el análisis, caracterización y uso agronómico, para expresar proteínas recombinantes para elevar los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención, como marcadores para tejidos en los cuales la proteína correspondiente se expresa (por ejemplo, preferiblemente, o no preferiblemente), como marcadores de hibridación sobre geles Southern, como marcadores genéticos para asistencia en el cruzamiento, como marcadores RFLP, como marcadores para genotipificación (variedades, etc.), y la proteína codificada, puede, como ultima medida, ser utilizada como marcador de peso molecular.

40 Los polinucleótidos de la presente divulgación también son útiles como marcadores o etiquetas de cromosomas (cuando están marcadas), para identificar cromosomas, para mapear posiciones de genes relacionados con un cromosoma, o como referencia comparativa para secuencias de ADN endógeno de plantas mutantes para identificar variantes alélicas, y/o mutaciones espontaneas o bióticas.

50 Los polinucleótidos de la presente divulgación también son útiles para detección de huellas genéticas, para seleccionar y hacer oligómeros para la unión de un "chip genético" u otro soporte incluyendo el examen de los patrones de expresión para genes en particular, para diferenciar fronteras de intrones y/o exones, para identificar variantes de división y/o alélicas, y como herramientas de diagnostico para la identificación de etapas de desarrollo, estados de enfermedad y/o niveles de nutrientes. La presente invención abarcar polinucleótidos que hibridizan al polinucleótido complementario para la secuencia de SEQ ID NO: 7 bajo condiciones restrictivas, donde el ácido

nucleico codifica una prenil proteasa. Tal hibridización puede ser utilizada para identificar ortólogos, homólogos, variantes alélicas, variantes y/o mutantes de los polinucleótidos de la presente invención.

5 Adicionalmente, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados para clonar ortólogos, homólogos, variantes alélicas, variantes, y/o mutantes de los polinucleótidos del presente, utilizando oligonucleótidos dirigidos a secuencias de polinucleótidos de la presente invención llevando a cabo PCR sobre muestras de células o tejidos de las plantas.

10 La presente divulgación abarca la identificación de proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas, que se enlazan a polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención (por ejemplo, en una interacción receptor-ligando). Los polinucleótidos de la presente divulgación también pueden utilizarse en pruebas de trampa de interacción (tales como, por ejemplo, las descritas por Ozenberger y Young (Mol Endocrinol., 9 (10): 1321-9, (1995); and Ann. N Y Acad Sci., 7 ; 766: 279-81, (1995)).

15 Usos potenciales de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación incluyen nutricionales (por ejemplo, un suplemento de aminoácidos), como una fuente de carbono, como una fuente de nitrógeno, como una fuente de carbohidratos, modulando la actividad de defensa de la planta, modulando las transducción de señales, modulando el transporte de metabolitos (por ejemplo, flujos de carbono , nitrógeno, etc), conferir tolerancia y/o resistencia a tensión abiótica (agua, sequedad, frío, sal, etc), conferir tolerancia y/o resistencia al estrés xenobiótico y control del desarrollo (por ejemplo, rendimiento, tiempo de floración, etc.).

20 El polinucleótido y polipéptido de la presente divulgación son útiles como sondas para la identificación y aislamiento de ADNc de longitud completa y/o ADN genómico los cuales corresponden a los polinucleótidos de la presente divulgación, como sondas para hibridizar y descubrir novedosas secuencias relacionadas con ADN, como sondas para clonación posicional de estos o una secuencia relacionada, como para sonda "substraer" secuencias conocidas en el proceso de descubrir otros polinucleótidos novedosos, como sondas para cuantificar la expresión genética, y como sondas para microdisposiciones.

25 Además, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más dominios de membrana.

También, la presente divulgación proporciona métodos para refinar adicionalmente la facción biológica de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente invención.

30 Específicamente, la divulgación proporciona métodos para utilizar los polinucleótidos y polipéptidos de la invención para identificar ortólogos, homólogos, variantes y/o variantes alélicas. También proporciona métodos para utilizar los polinucleótidos y polipéptidos de la divulgación para identificar la región de codificación completa de la invención, regímenes no codificantes, secuencias reguladoras de la invención, y formas secretadas, maduras, pro, pre pro, de la invención.

35 La divulgación proporciona métodos para identificar los sitios de glicosilación inherentes en los polinucleótidos y polipéptidos de la invención y la subsecuente alteración, eliminación y/o adición de dichos sitios para un cierto número de características deseables que incluyen, pero no se limitan, a aumento del plegamiento de proteínas, inhibición de la agregación de proteínas, regulación del tráfico intracelular entre organelos, resistencia incrementada a la proteólisis, modulación de la antigenicidad de las proteínas y mediación de la adición intercelular.

40 Se describen métodos para hacer evolucionar los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención utilizando evolución molecular en un esfuerzo para crear e identificar variantes novedosas con características estructurales, funcionales y/o físicas deseadas.

La presente divulgación proporciona otros métodos y procedimientos experimentales actualmente disponibles para derivar asignaciones funcionales. Estos procedimientos incluyen pero no se limitan a la ubicación de clones en disposiciones, tecnología de microdisposiciones, métodos basados en PCR y otros procedimientos que podrían utilizar la información secuencial de nuestros clones para construir un cebador o un asociado híbrido.

45 Tal como se utiliza aquí, el termino "tensión ambiental" se refiere a cualquier condición de crecimiento subóptima e incluye, pero no se limita a, aquellas condiciones subóptimas asociadas con tensiones por salinidad, sequedad, temperatura, metales, productos químicos, patógenas u oxidativas, o combinaciones de las mismas. En realizaciones preferidas, la tensión ambiental puede ser salinidad, sequedad o temperatura, o combinaciones de las mismas, y en particular puede ser alta salinidad, bajo contenido de agua o baja temperatura.

50 También se entiende que como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, "un" o "una" puede significar uno o mas, dependiendo del contexto en el cual se utilizan. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que al menos puede utilizarse una célula.

También como se utiliza aquí el término “ácido nucleico” y “polinucleótido” se refiere a un ARN o ADN que lineal o ramificado, de cadena sencilla o doble, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Estos términos también abarcan secuencias no traducidas localizadas tanto en los extremos 3’ como 5’ de la región de codificación del gen: al menos 1000 nucleótidos de la corriente de secuencia desde el extremo 5’ de la región de codificación y al menos aproximadamente 200 nucleótidos de la secuencia corriente abajo del extremo 3’ de la región de codificación del gen. O bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, y viruelaantina y otras pueden utilizarse también para el apareamiento antisentido, de ARNs y ribosomas. Por ejemplo, los polinucleótidos que contiene análogos de C-5 propina de la uridina y citidina han demostrado enlazarse al ARN con alta afinidad y ser potentes inhibidores antisentido de la expresión del gen. Otras modificaciones, tales como la modificación del esqueleto fosfodiéster, o del 2’-hidroxi en el grupo azúcar ribosa del ARN también pueden realizarse en este caso. Los polinucleótidos y ribosomas antisentido pueden consistir completamente de ribonucleótidos, pueden contener ribonucleótidos y dexosirribonucleótidos mixtos. Los polinucleótidos de la invención pueden ser producidos por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis in vitro, RT-PCR y transcripción in vitro o in vivo.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es aquella que está sustancialmente separada de las otras moléculas de ácidos nucleicos que están presentes en el fuente natural del ácido nucleico (esto es, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de alguna de la secuencias que de forma natural flanquean el ácido nucleico (esto es, secuencias localizadas en los extremos 5’ y 3’ del ácido nucleico) en su replicón de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada PPSRP puede contener menos de aproximadamente menos de 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0.5kb o 0.1kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula a partir de la cual se deriva el ácido nucleico. Un ácido nucleico también se considera aislado si ha sido alterado por la intervención humana, o colocado en un locus o localización que no es su sitio natural, o si es introducido en una célula por agroinfección. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar libre de otro material celular con el cual esta asociada de forma natural, o medios de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Específicamente excluidos de la definición de “ácidos nucleicos aislados” están: cromosomas de origen natural (tales como distribuciones de cromosomas), bibliotecas de cromosomas artificiales, bibliotecas genómicas, bibliotecas de ADNc que existen bien como una preparación de ácidos nucleicos in vivo o como un preparación de células huésped transfectadas/transformadas, donde la células huésped bien sea con preparaciones heterogéneas in vitro o sembradas como poblaciones heterogéneas de colonias simples. También específicamente se excluyen las bibliotecas donde un ácido nucleico con forma hasta menos del 5% del número de insertos de ácidos nucleicos en las moléculas vectoras. Adicionalmente de forma específica se excluye todas las preparaciones de ADN celular genómico o de ARN celular completo (incluyendo las preparaciones celulares completas que están separadas mecánicamente o digeridas enzimáticamente). Aun adicionalmente con mayor especificidad se excluyen todas las preparaciones celulares completas encotradas bien sea como preparaciones in vitro o como una mezcla heterogénea separada por electroforesis donde el ácido nucleico de la invención no ha sido separado adicionalmente de los ácidos nucleicos heterólogos en el medio de electroforesis (por ejemplo, separación adicional escindiendo una banda sencilla de una población de banda heterogénea en un gen de agarosa o en una siembra sobre nilón).

#### Polinucleótidos y Polipéptidos

##### Características del Polipéptido Codificado por el Gen: 1

El polipéptido de este gen provisto como SEQ ID NO: 2 (Figura 3), codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo a SEQ ID NO: 1 (Figura 2) tiene una homología significativa al nivel de nucleótidos y aminoácidos tanto con la prenil peptidasa humana como de levadura (Figura 12 A-D). Con base en la homología, el polipéptido puede compartir al menos una actividad biológica con las prenil peptidasas.

El polinucleótido y el polipéptido tienen usos que incluyen, pero no se limitan a conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal para las plantas. El polinucleótido también tiene usos que incluyen identificación de la longitud completa del PpPrPasa1.

Adicionalmente, los antagonistas dirigidos contra el polipéptido pueden ser útiles en aplicaciones fungicidas. La farnesilación de la chaperona bacteriana DnaJ es esencial para el crecimiento bacteriana a temperaturas elevadas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7). La farnesilación de esta chaperona se requiere para su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, la ANJ1 es un homólogo de la DnaJ y se induce por tratamientos con calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 The Plant Cell 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación, incremento de la farnesilación de las chaperonas de plantas que demostrado dar como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente llevan a una tolerancia incrementada frente al estrés por parte de las plantas. Por lo tanto, los polinucleótidos, y polipéptidos, incluyendo agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que

incluyen conferir resistencia al estrés por calor, sequedad y sal en las plantas. Alternativamente, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen modular la susceptibilidad de una planta a las tensiones bióticas y/o abióticas que incluyen, pero no se limitan a, tensión por calor, sequedad y sal en las plantas. Preferiblemente los antagonistas de la presente divulgación incluyen una resistencia de las plantas a la tensión por calor, sequedad y sal. La sobreexpresión de un polipéptido PrPasa de la presente divulgación dentro de una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en la célula guardián, sería útil para mejorar la tolerancia a la sequedad y la sal en una planta.

La farnesilación de una proteína esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 PNAS 97: 7633-8). Las mutaciones en los genes involucrados en la farnesilación de una proteína, ha saber farnesil transferasa, da como resultado la inhibición de la proliferación celular en plantas de Arabidopsis (Bonetta et al. 2000 Planta 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación celular incrementada, un crecimiento incrementado de la planta. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas, y potencialmente el rendimiento de la planta, preferiblemente un incremento en el crecimiento de la planta. Además, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento de la planta y/o su rendimiento, a través preferiblemente de un incremento en el crecimiento y rendimiento de la planta. La sobreexpresión del polipéptido de PpPrPasa1 de la presente divulgación utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), puede ser útil para el incremento del crecimiento de la planta por aceleración de la división celular.

Aunque se cree que el polipéptido codificado puede compartir al menos una de las actividades biológicas con las prenil proteasas, se conoce en la técnica un cierto número de métodos para determinar la función biológica exacta de este clon o se describen en algún lugar aquí. Brevemente, la función de este clon puede determinarse aplicando metodología de microarreglos. El clon PpPrPasa1 además de otros clones de la presente divulgación, puede disponerse sobre microchips para el perfil de la expresión. Dependiendo de que sonda de polinucleótido se utilice para hibridizar las lonjas, un cambio en la expresión de un gen específico puede proporcionar una visión adicional sobre la función de este gen con base en las condiciones que están siendo estudiadas. Por ejemplo, a medida que se observa el incremento o decremento en los niveles de expresión cuando la sonda de polinucleótidos usada bien de un tejido que ha sido tratado con frío podría indicar una función de la modulación de la tolerancia al frío, por ejemplo. En el caso de la PpPrPasa1, un tejido privado de agua o tensionado por otro tipo de tensiones bióticas o abióticas (calor, sequedad, alta luminosidad, alta salinidad, etc.) debería ser usado para extraer el ARN para preparar la sonda.

Además, la función de la proteína puede establecerse aplicando una metodología de PCR cuantitativa, por ejemplo, PCR cuantitativo en tiempo real podría proporcionar la capacidad de seguir la expresión de genes específicos a lo largo del ciclo de desarrollo de la planta, por ejemplo. La metodología de PCR cuantitativa requiere solamente una cantidad nominal de tejido de cada etapa de desarrollo importante (semillas con 3 vías de germinación, siembras de una semana de edad [raíces, brotes o tallos], raíces, hojas y tallos antes de la aparición de la florescencia, partes diferentes de las flores]; y/o embríos en desarrollo) son necesarios para llevar a cabo tales experimentos. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de PCR cuantitativa para refinar la función biológica de este polipéptido esta abarcada por la presente divulgación. También se abarcan en la presente divulgación las sondas cuantitativas de PCR correspondientes a la secuencia de polinucleótidos provistas como SEQ ID NO: 1 (Figura 2).

La función de la proteína también puede establecerse a través de ensayos de complementación en levaduras. Por ejemplo, en el caso del clon de PpPrPasa1 la transformación de levaduras deficientes en actividad de prenil proteasa y el establecimiento de su capacidad para el crecimiento proporcionaría evidencia convincente de que el clon PpPrPasa1 tiene actividad de prenil proteasa. Condiciones y métodos de ensayo adicionales que son usados en el establecimiento de la función de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se divulgan aquí.

Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede ser determinada perturbando un homólogo de este polipéptido en *Synechosystis*.

Las cianobacterias (algas azul-verdes) se consideran precursores de los cloroplastos de las plantas. Posee ambos sistemas fotosintéticos y muchos otros procesos metabólicos que recuerdan a los de las plantas. Estos procesos son frecuentemente objetivo de muchos herbicidas comerciales, y este organismo ha sido utilizado ampliamente en el estudio del modo de acción de muchas clases de herbicidas. El *Synechosystis* es una de las cianobacterias mejor estudiadas.

Además de la mayoría de las características comunes a las cianobacterias, ofrecen muchas otras ventajas adicionales. La *Synechosystis* tiene un sistema de transformación genética de origen natural, permitiendo así una manipulación genética y molecular vigorosa y sofisticada (por ejemplo, perturbación orientada a un gen, reemplazo de genes, etc.) aplicable a algunos de los sistemas bien caracterizados (*S. cerevisiae*, *E. coli*). De la forma más importante, la disponibilidad de la información sobre la secuencia genómica completa del *Synechosystis* permite que

se facilite una identificación rápida y una clonación del gen (o genes) de interés, y la elucidación de la función genética a través de medios genéticos y moleculares.

Además, la función biológica de este polipéptido puede determinarse por la aplicación de una metodología de antisentido y/o sentido y la generación resultante de plantas transgénicas. La expresión de un gen particular en cualquier sentido u orientación antisentido en una planta transgénica puede llevar respectivamente bien a niveles de expresión más altos o más bajos del gen en particular. Al alterar los niveles de expresión endógena puede conducirse a la alteración de un fenotipo particular que pueda ser utilizado para derivar indicaciones de la función del gen. El gen bien puede ser sobreexpresado o subexpresado en cada célula de la planta cada vez utilizando un promotor ubicuo fuerte, o puede ser expresado en una o más partes discretas de la planta utilizando un promotor específico para un tejido bien caracterizado (por ejemplo, un promotor de raíz o un promotor específico para flores), o puede ser expresado en un tiempo especificado del desarrollo utilizando un promotor regulado inducible y/o regulado en el desarrollo.

En el caso de plantas transgénicas PpPrPasa1 si no hay un fenotipo evidente en condiciones normales de crecimiento, la observación de plantas bajo condiciones de tensión (privación de agua, presencia de altas cantidades de sal, u otras tensiones bióticas o abióticas, tales como frío, calor, sequía, alta luminosidad, etc.) puede llevar al entendimiento de la función del gen. En el caso del análisis bioquímico de compuestos almacenados en las semillas tales como aceites, azúcares y proteínas (véase Ejemplo 34) puede llevar al entendimiento de la función del gen. Por lo tanto la aplicación de la metodología antisentido y/o sentido para la creación de plantas transgénicas para refinar la función biológica del polipéptido es abarcada por la presente divulgación.

Los siguientes mutantes de eliminación N-terminal son abarcados por la presente divulgación: L1-D394, K2-D394, L3-D394, S4-D394, N5-D394, L6-D394, P7-D394, A8-D394, P9-D394, L10-D394, K11-D394, G12-D394, I13-D394, V14-D394, S15-D394, Q16-D394, E17-D394, K18-D394, F19-D394, E20-D394, K21-D394, A22-D394, Q23-D394, A24-D394, Y25-D394, S26-D394, L27-D394, D28-D394, K29-D394, S30-D394, R31-D394, F32-D394, H33-D394, F34-D394, V35-D394, H36-D394, A37-D394, A38-D394, V39-D394, N40-D394, I41-D394, V42-D394, E43-D394, E44-D394, S45-D394, A46-D394, I47-D394, L48-D394, L49-D394, L50-D394, G51-D394, L52-D394, L53-D394, P54-D394, W55-D394, A56-D394, W57-D394, D58-D394, K59-D394, S60-D394, G61-D394, S62-D394, L63-D394, V64-D394, G65-D394, K66-D394, L67-D394, G68-D394, F69-D394, D70-D394, E71-D394, K72-D394, S73-D394, E74-D394, I75-D394, L76-D394, Q77-D394, T78-D394, L79-D394, S80-D394, F81-D394, L82-D394, A83-D394, V84-D394, T85-D394, T86-D394, L87-D394, W88-D394, S89-D394, Q90-D394, I91-D394, L92-D394, E93-D394, L94-D394, P95-D394, F96-D394, S97-D394, L98-D394, Y99-D394, S100-D394, T101-D394, F102-D394, V103-D394, I104-D394, E105-D394, A106-D394, R107-D394, H108-D394, G109-D394, F110-D394, N111-D394, K112-D394, Q113-D394, T114-D394, I115-D394, W116-D394, L117-D394, F118-D394, L119-D394, R120-D394, D121-D394, M122-D394, I123-D394, M124-D394, G125-D394, L126-D394, A127-D394, L128-D394, M129-D394, M130-D394, V131-D394, V132-D394, G133-D394, P134-D394, P135-D394, I136-D394, V137-D394, S138-D394, A139-D394, I140-D394, I141-D394, Y142-D394, I143-D394, V144-D394, Q145-D394, N146-D394, G147-D394, G148-D394, P149-D394, Y150-D394, L151-D394, A152-D394, L153-D394, Y154-D394, W155-D394, A157-D394, F158-D394, M159-D394, L160-D394, L161-D394, L162-D394, S163-D394, L164-D394, V165-D394, L166-D394, M167-D394, A168-D394, L169-D394, Y170-D394, P171-D394, V172-D394, L173-D394, I174-D394, A175-D394, P176-D394, L177-D394, F178-D394, N179-D394, T180-D394, F181-D394, T182-D394, P183-D394, L184-D394, P185-D394, E186-D394, G187-D394, Q188-D394, L189-D394, R190-D394, A191-D394, K192-D394, I193-D394, E194-D394, K195-D394, L196-D394, A197-D394, S198-D394, S199-D394, L200-D394, D201-D394, F202-D394, P203-D394, L204-D394, K205-D394, K206-D394, L207-D394, F208-D394, V209-D394, I210-D394, D211-D394, G212-D394, S213-D394, T214-D394, R215-D394, S216-D394, S217-D394, H218-D394, S219-D394, N220-D394, A221-D394, Y222-D394, M223-D394, Y224-D394, G225-D394, F226-D394, Y227-D394, N228-D394, S229-D394, K230-D394, R231-D394, I232-D394, V233-D394, L234-D394, Y235-D394, D236-D394, T237-D394, L238-D394, I239-D394, S240-D394, Q241-D394, C242-D394, K243-D394, N244-D394, E245-D394, E246-D394, E247-D394, V248-D394, V249-D394, A250-D394, V251-D394, I252-D394, A253-D394, H254-D394, E255-D394, L256-D394, G257-D394, H258-D394, W259-D394, K260-D394, L261-D394, S262-D394, H263-D394, T264-D394, M265-D394, Y266-D394, S267-D394, F268-D394, L269-D394, A270-D394, M271-D394, Q272-D394, V273-D394, L274-D394, T275-D394, L276-D394, L277-D394, Q278-D394, F279-D394, G280-D394, G281-D394, Y282-D394, T283-D394, L284-D394, V285-D394, R286-D394, N287-D394, S288-D394, S289-D394, G290-D394, L291-D394, F292-D394, L293-D394, S294-D394, F295-D394, G296-D394, F297-D394, S298-D394, T299-D394, Q300-D394, P301-D394, V302-D394, L303-D394, I304-D394, G305-D394, L306-D394, I307-D394, L308-D394, F309-D394, Q310-D394, H311-D394, T312-D394, I313-D394, M314-D394, P315-D394, F316-D394, H317-D394, H318-D394, L319-D394, V320-D394, S321-D394, F322-D394, A323-D394, L324-D394, N325-D394, L326-D394, L327-D394, S328-D394, R329-D394, A330-D394, F331-D394, E332-D394, F333-D394, Q334-D394, A335-D394, D336-D394, A337-D394, F338-D394, A339-D394, R340-D394, S341-D394, L342-D394, G343-D394, Y344-D394, R345-D394, E346-D394, P347-D394, L348-D394, R349-D394, A350-D394, G351-D394, L352-D394, I353-D394, K354-D394, L355-D394, Q356-D394, E357-D394, E358-D394, N359-D394, L360-D394, S361-D394, A362-D394, M363-D394, N364-D394, T365-D394, D366-D394, P367-D394, W368-D394, Y369-D394, S370-D394, A371-D394, Y372-D394, H373-D394, H374-D394, S375-D394, H376-D394, P377-D394, P378-D394, L379-D394, V380-D394, E381-D394, R382-D394, L383-D394, Q384-D394, A385-D394, L386-D394, D387-D394, E388-D394, de SEQ ID NO : 2. En las

secuencias de polipéptidos que codifican estos polipéptidos también se proporcionan las secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Los siguientes mutantes de eliminación de terminal C son abarcados por la presente divulgación: L1-D394, L1-T393, L1-K392, L1-K391, L1-S390, L1-T389, L1-E388, L1-D387, L1-L386, L1-A385, L1-Q384, L1-L383, L1-R382, L1-E381, L1-V380, L1-L379, L1-P378, L1-P377, L1-H376, L1-S375, L1-H374, L1-H373, L1-Y372, L1-A371, L1-S370, L1-Y369, L1-W368, L1-P367, L1-D366, L1-T365, L1-N364, L1-M363, L1-A362, L1-S361, L1-L360, L1-N359, L1-E358, L1-E357, L1-Q356, L1-L355, L1-K354, L1-I353, L1-L352, L1-G351, L1-A350, L1-R349, L1-L348, L1-P347, L1-E346, L1-R345, L1-Y344, L1-G343, L1-L342, L1-S341, L1-R340, L1-A339, L1-F338, L1-A337, L1-D336, L1-A335, L1-Q334, L1-F333, L1-E332, L1-F331, L1-A330, L1-R329, L1-S328, L1-L327, L1-L326, L1-N325, L1-L324, L1-A323, L1-F322, L1-S321, L1-V320, L1-L319, L1-H318, L1-H317, L1-F316, L1-P315, L1-M314, L1-I313, L1-T312, L1-H311, L1-Q310, L1-F309, L1-L308, L1-I307, L1-L306, L1-G305, L1-I304, L1-L303, L1-V302, L1-P301, L1-Q300, L1-T299, L1-S298, L1-F297, L1-G296, L1-F295, L1-S294, L1-L293, L1-F292, L1-L291, L1-G290, L1-S289, L1-S288, L1-N287, L1-R286, L1-V285, L1-L284, L1-T283, L1-Y282, L1-G281, L1-G280, L1-F279, L1-Q278, L1-L277, L1-L276, L1-T275, L1-L274, L1-V273, L1-Q272, L1-M271, L1-A270, L1-L269, L1-F268, L1-S267, L1-Y266, L1-M265, L1-T264, L1-H263, L1-S262, L1-L261, L1-K260, L1-W259, L1-H258, L1-G257, L1-L256, L1-E255, L1-H254, L1-A253, L1-I252, L1-V251, L1-A250, L1-V249, L1-V248,

L1-E247, L1-E246, L1-E245, L1-N244, L1-K243, L1-C242, L1-Q241, L1-S240, L1-I239, L1-L238, L1-T237, L1-D236, L1-Y235, L1-L234, L1-V233, L1-I232, L1-R231, L1-K230, L1-S229, L1-N228, L1-Y227, L1-F226, L1-G225, L1-Y224, L1-M223, L1-Y222, L1-A221, L1-N220, L1-S219, L1-H218, L1-S217, L1-S216, L1-R215, L1-T214, L1-S213, L1-G212, L1-D211, L1-I210, L1-V209, L1-F208, L1-L207, L1-K206, L1-K205, L1-L204, L1-P203, L1-F202, L1-D201, L1-L200, L1-I199, L1-S198, L1-A197, L1-L196, L1-K195, L1-E194, L1-I193, L1-K192, L1-A191, L1-R190, L1-L189, L1-Q188, L1-G187, L1-I186, L1-P185, L1-L184, L1-P183, L1-T182, L1-F181, L1-T180, L1-N179, L1-F178, L1-L177, L1-P176, L1-A175, L1-I174, L1-L173, L1-V172, L1-P171, L1-Y170, L1-L169, L1-A168, L1-M167, L1-L166, L1-V165, L1-L164, L1-S163, L1-L162, L1-L161, L1-L160, L1-M159, L1-F158, L1-A157, L1-W156, L1-L155, L1-Y154, L1-L153, L1-A152, L1-L151, L1-Y150, L1-P149, L1-G148, L1-G147, L1-N146, L1-Q145, L1-V144, L1-I143, L1-Y142, L1-I141, L1-I140, L1-A139, L1-S138, L1-V137, L1-I136, L1-P135, L1-P134, L1-G133, L1-V132, L1-V131, L1-M130, L1-M129, L1-L128, L1-A127, L1-L126, L1-G125, L1-M124, L1-I123, L1-M122, L1-D121, L1-R120, L1-L119, L1-F118, L1-L117, L1-W116, L1-I115, L1-T114, L1-Q113, L1-K112, L1-N111, L1-F110, L1-G109, L1-H108, L1-R107, L1-A106, L1-E105, L1-I104, L1-V103, L1-F102, L1-T101, L1-S100, L1-Y99, L1-L98, L1-S97, L1-F96, L1-P95, L1-L94, L1-E93, L1-L92, L1-I91, L1-Q90, L1-S89, L1-W88, L1-L87, L1-T86, L1-T85, L1-V84, L1-A83, L1-L82, L1-F81, L1-S80, L1-L79, L1-T78, L1-Q77, L1-L76, L1-I75, L1-E74, L1-S73, L1-K72, L1-E71, L1-D70, L1-F69, L1-G68, L1-L67, L1-K66, L1-G65, L1-V64, L1-L63, L1-S62, L1-G61, L1-S60, L1-K59, L1-D58, L1-W57, L1-A56, L1-W55, L1-P54, L1-L53, L1-L52, L1-G51, L1-L50, L1-L49, L1-L48, L1-I47, L1-A46, L1-S45, L1-E44, L1-E43, L1-V42, L1-I41, L1-N40, L1-V39, L1-A38, L1-A37, L1-H36, L1-V35, L1-F34, L1-H33, L1-F32, L1-R31, L1-S30, L1-K29, L1-D28, L1-L27, L1-S26, L1-Y25, L1-A24, L1-Q23, L1-A22, L1-K21, L1-E20, L1-F19, L1-K18, L1-E17, L1-Q16, L1-S15, L1-V14, L1-I13, L1-G12, L1-K11, L1-L10, L1-P9 L1-A8, L1-P7, de SEQ ID NO : 2.

También se proporcionan las secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Características del Polipéptido Codificado por el Gen No: 2.

40 El polipéptido de este gen provisto como SEQ ID NO:4 (Figura 5), codificado por la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 (Figura 4), AtPrPasa1, tiene homología significativa al nivel de nucleótidos y aminoácidos tanto para prenil peptidasas tanto humanas como de levadura (véase Figura 12 A-D), con base en la homología, el polipéptido puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil peptidasas.

45 El polinucleótido y polipéptido, incluyendo agonistas tiene usos que incluyen, pero no se limitan a conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, particularmente Arabidopsis. Alternativamente, los antagonistas dirigidos contra el polipéptido también pueden ser útiles en conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, en particular Arabidopsis.

50 La divulgación también abarca el promotor del gen AtPrPasa1 (SEQ ID NO: 11, Figuras 15 A-B). El promotor tiene usos que incluye, pero no se limitan a, dirigir la expresión de un gen de interés a celular guardián de plantas. El gen de interés puede ser cualquier gen endógeno para una planta, un gen no derivado de plantas (por ejemplo, viral, de mamífero, humano, sintético, evolucionado molecularmente, bacteriano, fúngico, etc.), un gen informador, un gen marcador, un camino de entrada deseado, un camino de salida deseado, un gen capaz de conferir un fenotipo específico en una planta, o uno o más genes de la presente divulgación, genes de anticuerpos, genes de anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente divulgación, genes antisentido, además de otros genes conocidos en la técnica y/o divulgados aquí.

55 La farnesilación de la chaperona bacteriana DnaJ es esencial para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7). La farnesilación de estas chaperonas se requiere para su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, el ANJ1 es un homólogo del DnaJ y es inducido por tratamientos con

calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 *The Plant Cell* 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación. El incremento en la farnesilación de las chaperonas de las plantas ha mostrado como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente lleva a una tolerancia incrementada al estrés en las plantas.

5 Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo los agonistas y/o fragmentos de las mismas tiene usos que incluyen conferir resistencia a estrés por calor, sequedad y sal en plantas. Alternativamente, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen modular una susceptibilidad de las plantas a tensiones bióticas y/o abióticas que incluyen, pero no se limitan a tensiones por calor, sequedad y sal en plantas. Preferiblemente los antagonistas de la presente divulgación incrementan una resistencia de las plantas al estrés por calor, sequedad y sal. La sobreexpresión del polipéptido de AtPrPasa1 de la presente divulgación como una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en la célula guardián, serian útiles para mejorar la tolerancia a la sequedad y la sal.

15 La farnesilación de las proteínas esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 *PNAS* 97: 7633-8). La mutación en los genes involucrados en la farnesilación de las plantas, ha saber la farnesil transferasa, da como resultado la inhibición de la proliferación celular en plantas de *Arabidopsis* (Bonetta et al. 2000 *Planta* 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación incrementada de las células, crecimiento incrementado de las plantas. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación que incluyen agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas, y potencialmente el rendimiento de las plantas, incrementándose preferiblemente el crecimiento de las plantas. Además, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas y/o del rendimiento, a través preferiblemente del incremento del crecimiento y rendimiento de las plantas. La sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa de la presente divulgación utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí) puede ser útil para incrementar el crecimiento de las plantas acelerando la división celular.

25 Aunque se cree que el polipéptido codificado puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil proteasas, se conocen en la técnica un cierto número para determinar la función biológica exacta de este clon o bien se describen en algún lugar aquí. Brevemente, la función de este clon puede determinarse aplicando una metodología de microarreglos. El clon AtPrPasa1, además de otros clones en la presente divulgación, puede ser dispuesto en microchips para perfiles de expresión. Dependiendo de que sonda de polinucleótidos utilizada para hibridizar las lonjas, un cambio en expresión para un gen específico puede proveer una visión adicional en la función de este gen con base en las condiciones que están siendo estudiadas. Por ejemplo, un incremento o decremento observado en los niveles de expresión cuando en la sonda de polinucleótido usada viene de un tejido que ha sido tratado con frío podría indicar una función en la modulación de la tolerancia al frío, por ejemplo. En el caso de la AtPrPasa1, debería usarse un tejido privado de agua o tensionado por otras tensiones bióticas o abióticas (calor, sequedad, alta luminosidad, alta salinidad, etc.) para extraer el ARN para preparar la sonda.

30 Además, la función de la proteína puede establecerse aplicando metodología de PCR cuantitativo, por ejemplo, PCR cuantitativo en tiempo real que proporcionaría la capacidad de seguir la expresión de los genes específicos a través del ciclo de desarrollo de la planta, por ejemplo. La metodología de PCR cuantitativo requiere solamente una cantidad nominal de tejido de cada etapa importante del desarrollo (semillas germinadas de 3 días, semillas de una semana de edad [raíces, brotes y tallos]; raíces, hojas y tallos antes de la aparición de la florescencia, flores [partes diferentes]; y/o embriones en desarrollo) para llevar a cabo tales experimentos. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de PCR cuantitativo para refinar la función biológica de este polipéptido es abarcada por la presente divulgación. También se abarcan en la presente divulgación sondas de PCR cuantitativo correspondientes la secuencia de nucleótidos proporcionada como SEQ ID NO: 3(Figura 4).

45 La función de la proteína también puede establecerse a través de ensayos de complementación en levadura. Por ejemplo, en el caso del clon AtPrPasa1, la transformación de la levadura deficiente en la actividad de prenil proteasa, y el establecimiento de su capacidad para crecer proporcionaría evidencia convincente de que el clon de AtPrPasa1 tiene actividad de prenil proteasa. Las condiciones y métodos de ensayo adicionales que pueden utilizarse para establecer la función de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se divulgan aquí en algún lugar.

55 Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede determinarse perturbando un homólogo de este polipéptido en *Synechosistis*. Las cianobacterias (algas azul-verde) se consideran como precursores del cloroplasto de las plantas. Poseen sistemas tanto fotosintéticos como muchos otros procesos metabólicos reminiscentes de los de las plantas. Estos procesos frecuentemente son objetivo para muchos herbicidas comerciales, y este organismo ha sido utilizado ampliamente en el estudio del modo de acción de muchas clases de herbicidas. La *Synechosistis* es una de las cianobacterias mejor estudiadas.

Además de la mayor parte de las características comunes a las cianobacterias, ofrece muchas otras ventajas añadidas. La *Synechosistis* tiene un sistema de transformación genético de origen natural, que permite así una

manipulación genética y molecular vigorosa y sofisticada (por ejemplo, perturbación apuntada a genes, reemplazo de genes, etc.) aplicable a algunos de los sistemas bien caracterizados (*S. cerevisiae*, *E. coli*). De forma más importante, la disponibilidad de la información de la secuencia genómica completa del *Synecosistis* permite un camino rápido para la identificación veloz y clonación del gen (o genes) de interés, y la elucidación de la función de los genes a través de medios genéticos y moleculares.

Adicionalmente, la función biológica de este polipéptido puede determinarse mediante la aplicación de metodología antisentido y/o sentido y la generación resultante de plantas transgénicas. La expresión de un gen en particular bien sea en orientación sentido o antisentido en una planta transgénica puede llevar respectivamente a niveles más altos a más bajos de expresión de ese gen. La alteración de los niveles de expresión endógenos de un gen puede conducir a la observación de un fenotipo particular que puede ser usado entonces para derivar indicaciones sobre la función del gen. El gen bien puede ser sobrexpresado o subexpresado en cada célula de la planta en todo momento utilizando un promotor ubicuo fuerte, o puede ser expresado en una o más partes discretas de la planta utilizando un promotor específico de un tejido bien caracterizado (esto es, un promotor de raíces o un promotor específico para flores o un promotor específico para semillas), o puede ser expresado en un tiempo especificado de desarrollo utilizando un promotor inducible y/o regulado por el desarrollo.

En el caso de *AtPrPasa1* de plantas transgénicas, si no hay un fenotipo evidente en condiciones normales de crecimiento, la observación de las plantas bajo condiciones de tensión (privación de agua, de presencia de alta salinidad u otras tenciones bióticas y abióticas, tales como frío, calor, sequedad, alta luminosidad, etc.) o el análisis bioquímico de semillas con almacenamiento de compuestos puede llevar al entendimiento de la función del gen. Por lo tanto, la aplicación de la metodología antisentido y/o sentido a la creación de plantas transgénicas para refinar la función biológica del polipéptido esta abarcada por la presente divulgación.

Los siguiente mutantes por eliminación N-terminal están abarcados por la presente divulgación: M1-D424, A2-D424, I3-D424, P4-D424, F5- D424, M6-D424, E7-D424, T8-D424, V9-D424, V10-D424, G11-D424, F12-D424, M13-D424, I14-D424, V15-D424, M16-D424, Y17-D424, I18-D424, F19-D424, E20-D424, T21-D424, Y22-D424, L23-D424, D24-D424, L25- D424, R26-D424, Q27-D424, L28-D424, T29-D424, A30-D424, L31-D424, K32-D424, L33-D424, P34-D424, T35-D424, L36-D424, P37-D424, K38-D424, T39-D424, L40-D424, V41-D424, G42-D424, V43-D424, I44-D424, S45-D424, Q46- D424, E47-D424, K48-D424, F49-D424, E50-D424, K51-D424, S52-D424, R53-D424, A54-D424, Y55-D424, S56-D424, L57-D424, D58-D424, K59-D424, S60-D424, Y61-D424, F62-D424, H63-D424, F64-D424, V65-D424, H66-D424, E67- D424, F68-D424, V69-D424, T70-D424, I71-D424, L72-D424, M73-D424, D74-D424, S75-D424, A76-D424, I77-D424, L78-D424, F79-D424, F80-D424, G81-D424, I82-D424, L83- D424, P84-D424, W85-D424, F86-D424, W87-D424, K88- D424, M89-D424, S90- D424, G91-D424, A92-D424, V93-D424, L94-D424, P95-D424, R96-D424, L97-D424, G98- D424, L99-D424, D100-D424, P101-D424, E102-D424, N103-D424, E104-D424, I105-D424, L106-D424, H107-D424, T108-D424, L109-D424, S110- D424, F111-D424, L112-D424, A113-D424, G114-D424, V115-D424, M116-D424, T117-D424, W118-D424, S119-D424, Q120-D424, I121-D424, T122-D424, D123- D424, L124-D424, P125-D424, F126-D424, S127-D424, L128-D424, Y129-D424, S130-D424, T131-D424, F132-D424, V133-D424, I134-D424, E135- D424, S136- D424, R137-D424, H138-D424, G139-D424, F140-D424, N141-D424, K142-D424, Q143-D424, T144- D424, I145-D424, W146-D424, M147-D424, F148-D424, I149- D424, R150-D424, D151-D424, M152-D424, I153-D424, K154-D424, G155-D424, T156-D424, F157-D424, L158-D424, S159-D424, V160-D424, I161-D424, L162- D424, G163- D424, P164-D424, P165-D424, I166-D424, V167-D424, A168-D424, A169-D424, I170-D424, I171-D424, F172-D424, I173-D424, V174-D424, Q175- D424, K176-D424, G177-D424, G178-D424, P179-D424, Y180-D424, L181-D424, A182- D424, I183-D424, Y184-D424, L185-D424, W186-D424, A187-D424, F188- D424, M189-D424, F190-D424, I191-D424, L192-D424, S193-D424, L194-D424, V195-D424, M196-D424, M197-D424, T198-D424, I199-D424, Y200-D424, P201- D424, V202-D424, L203-D424, I204-D424, A205-D424, P206-D424, L207-D424, F208-D424, N209-D424, K210-D424, F211-D424, T212-D424, P213-D424, L214- D424, P215-D424, D216-D424, G217-D424, D218-D424, L219-D424, R220-D424, E221-D424, K222-D424, I223-D424, E224-D424, K225-D424, L226-D424, A227- D424, S228-D424, S229- D424, L230-D424, K231-D424, F232-D424, P233-D424, L234-D424, K235-D424, K236-D424, L237-D424, F238-D424, V239-D424, V240- D424, D241-D424, G242-D424, S243-D424, T244-D424, R245-D424, S246-D424, S247-D424, H248-D424, S249-D424, N250-D424, A251-D424, Y252-D424, M253-D424, Y254-D424, G255-D424, F256-D424, F257-D424, K258-D424, N259-D424, K260-D424, R261-D424, I262-D424, V263-D424, L264-D424, Y265-D424, D266- D424, T267-D424, L268-D424, I269-D424, Q270-D424, Q271-D424, C272-D424, K273-D424, N274-D424, E275-D424, D276-D424, E277-D424, I278-D424, V279- D424, A280-D424, V281-D424, I282-D424, A283-D424, H284-D424, E285- D424, L286-D424, G287-D424, H288-D424, W289-D424, K290-D424, L291-D424, N292- D424, H293-D424, T294- D424, T295-D424, Y296-D424, S297-D424, F298-D424, I299-D424, A300-D424, V301-D424, Q302-D424, I303-D424, L304-D424, A305- D424, F306-D424, L307-D424, Q308-D424, F309-D424, G310-D424, G311-D424, Y312-D424, T313-D424, L314-D424, V315-D424, R316-D424, N317-D424, S318-D424, T319-D424, D320-D424, L321-D424, F322- D424, R323-D424, S324-D424, F325-D424, G326-D424, F327-D424, D328-D424, T329-D424, Q330-D424, P331- D424, V332-D424, L333-D424, I334-D424, G335-D424, L336-D424, I337-D424, I338-D424, F339-D424, Q340-D424, H341-D424, T342-D424, V343-D424, I344- D424, P345-D424, L346-D424, Q347-D424, H348-D424, P349-D424, V350- D424, S351-D424, F352-D424, G353-D424, L354-D424, N355-D424, L356-D424, V357- D424, S358-D424, R359- D424, A360-D424, F361-D424, E362-D424, F363-D424, Q364-D424, A365-D424, D366-D424, A367-D424, F368-D424, A369-D424, V370- D424, K371-D424, L372-D424, G373-D424,

5 Y374-D424, A375-D424, K376-D424, D377-D424, L378-D424, R379-D424, P380-D424, T381-D424, L382-D424, V383-D424, K384-D424, L385-D424, Q386-D424, E387-D424, E388-D424, N389-D424, L390-D424, S391-D424, A392-D424, M393-D424, N394-D424, T395-D424, D396-D424, P397-D424, L398-D424, Y399-D424, S400-D424, A401-D424, Y402-D424, H403-D424, Y404-D424, S405-D424, H406-D424, P407-D424, P408-D424, L409-D424, V410-D424, E411-D424, R412-D424, L413-D424, R414-D424, A415-D424, I416-D424, D417-D424, G418-D424, de SEQ ID NO : 4. También se proporcionan las secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

10 Los siguientes mutantes por eliminación de C terminal son abarcados por la presente divulgación: M1-D424, M1-T423, M1-K422, M1-K421, M1-D420, M1-E419, M1-G418, M1-D417, MI-I416, MI-A415, M1-R414, MI-L413, M1-R412, M1-E411, M1-V410, M1-L409, M1-P408, M1-P407, M1-H406, M1-S405, M1-Y404, M1-H403, M1-Y402, M1-A401, M1-S400, M1-Y399, M1-L398, M1-P397, M1-D396, M1-T395, M1-N394, M1-M393, M1-A392, M1-S391, M1-L390, MI-N389, M1-E388, M1-E387, M1-Q386, M1-L385, M1-K384, M1-V383, M1-L382, M1-T381, M1-P380, M1-R379, M1-L378, M1-D377, M1-K376, M1-A375, MI-Y374, M1-G373, MI-L372, M1-K371, M1-V370, MI-A369, M1-F368, M1-A367, M1-D366, M1-A365, M1-Q364, M1-F363, M1-E362, M1-F361, M1-A360, M1-R359, M1-S358, M1-V357, M1-L356, M1-N355, M1-L354, M1-G353, M1-F352, M1-S351, M1-V350, M1-P349, M1-H348, M1-Q347, M1-L346, M1-P345, MI-1344, M1-V343, M1-T342, M1-H341, M1-Q340, M1-F339, M1-1338, M1-1337, M1-L336, M1-G335, M1-I334, M1-L333, M1-V332, M1-P331, M1-Q330, M1-T329, M1-D328, M1-F327, M1-G326, M1-F325, M1-S324, M1-R323, M1-F322, M1-L321, M1-D320, M1-T319, M1-S318, M1-N317, M1-R316, M1-V315, M1-L314, M1-T313, M1-Y312, M1-G311, M1-G310, M1-F309, M1-Q308, M1-L307, M1-F306, M1-A305, M1-L304, M1-I303, M1-Q302, M1-V301, M1-A300, M1-I299, M1-F298, M1-S297, M1-Y296, M1-T295, M1-T294, M1-H293, M1-N292, M1-L291, M1-K290, M1-W289, M1-H288, M1-G287, M1-L286, M1-E285, M1-H284, M1-A283, M1-I282, M1-V281, M1-A280, M1-V279, M1-I278, M1-E277, M1-D276, M1-E275, M1-N274, M1-K273, M1-C272, M1-Q271, M1-Q270, M1-I269, M1-L268, M1-T267, M1-D266, M1-Y265, M1-L264, M1-V263, M1-I262, M1-R261, M1-K260, M1-N259, M1-K258, M1-F257, M1-F256, M1-G255, M1-Y254, M1-M253, M1-Y252, M1-A251, M1-N250, M1-S249, M1-H248, M1-S247, M1-S246, M1-R245, M1-T244, M1-S243, M1-G242, M1-D241, M1-V240, M1-V239, M1-F238, M1-L237, M1-K236, M1-K235, M1-L234, M1-P233, M1-F232, M1-K231, M1-L230, M1-S229, M1-S228, M1-A227, M1-L226, M1-K225, M1-E224, M1-I223, M1-K222, M1-E221, M1-R220, M1-L219, M1-D218, M1-G217, M1-D216, M1-P215, M1-L214, M1-P213, M1-T212, M1-F211, M1-K210, M1-N209, M1-F208, M1-L207, M1-P206, M1-A205, M1-I204, M1-L203, M1-V202, M1-P201, M1-Y200, MI-II99, M1-T198, M1-M197, M1-M196, M1-V195, M1-L194, M1-S193, M1-L192, MI-1191, M1-F190, M1-M189, M1-F188, M1-A187, M1-W186, M1-L185, M1-Y184, M1-I183, M1-A182, M1-L181, M1-Y180, M1-P179, M1-G178, M1-G177, M1-K176, M1-Q175, M1-V174, M1-I173, M1-F172, M1-I171, M1-I170, M1-A169, M1-A168, M1-V167, M1-I166, M1-P165, M1-P164, M1-G163, M1-L162, M1-I161, M1-V160, M1-S159, M1-L158, M1-F157, M1-T156, M1-G155, M1-K154, M1-I153, M1-M152, M1-D151, M1-R150, M1-I149, M1-F148, M1-M147, M1-W146, M1-I145, M1-T144, MI-Q143, M1-K142, M1-N141, M1-F140, M1-G139, M1-H138, M1-R137, M1-S136, M1-E135, M1-I134, M1-V133, M1-F132, M1-T131, MI-S130, M1-Y129, M1-L128, M1-S127, M1-F126, M1-P125, M1-L124, M1-D123, M1-T122, M1-I121, M1-Q120, M1-S119, M1-W118, M1-T117, M1-M116, M1-V115, M1-G114, M1-A113, M1-L112, MI-F111, M1-S110, M1-L109, M1-T108, M1-H107, M1-L106, M1-I105, M1-E104, M1-N103, M1-E102, M1-P101, M1-D100, MI-L99, M1-G98, M1-L97, M1-R96, MI-P95, M1-L94, M1-V93, M1-A92, M1-G91, M1-S90, M1-M89, M1-K88, M1-W87, M1-F86, M1-W85, M1-P84, M1-L83, M1-I82, M1-G81, M1-F80, M1-F79, M1-L78, M1-I77, M1-A76, M1-S75, M1-D74, M1-M73, M1-L72, M1-I71, M1-T70, M1-V69, M1-F68, M1-E67, M1-H66, M1-V65, M1-F64, M1-H63, M1-F62, M1-Y61, M1-S60, M1-K59, M1-D58, M1-L57, M1-S56, M1-Y55, M1-A54, M1-R53, M1-S52, M1-K51, M1-E50, M1-F49, M1-K48, M1-E47, M1-Q46, M1-S45, M1-I44, M1-V43, M1-G42, M1-V41, M1-L40, M1-T39, M1-K38, M1-P37, M1-L36, M1-T35, M1-P34, M1-L33, M1-K32, M1-L31, M1-A30, M1-T29, M1-L28, M1-Q27, M1-R26, M1-L25, M1-D24, M1-L23, M1-Y22, M1-T21, M1-E20, M1-F19, MI-I18, MI-Y17, M1-M16, M1-V15, Mol-114, M1-M13, MI-F12, M1-G11, MI-V10, M1-V9, M1-T8, M1-E7, de SEQ ID NO : 4.

También se proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

50 Muchas secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias EST, son disponibles públicamente y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEQ ID NO: 3 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados están excluidos específicamente del alcance de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada sería engorroso. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente se excluyen de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita por la fórmula general de A-B, donde A es un entero entre 1 a 1275 de SEQ ID NO: 3, B es un entero entre 15 a 1275, donde tanto A como B corresponden a la posiciones de los residuos de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 3, y donde B es mayor igual o igual a +14.

Características del polipéptido codificado por el gen No: 3

60 El polipéptido de este gen provisto como SEQ ID NO:6 (Figura 7), codificado por la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 5 (Figura 6), AtPrPasa2, tiene homología significativa al nivel de nucleótidos y aminoácidos tanto para prenil peptidasas tanto humanas como de levadura (véase Figura 12 A-D), con base en la homología, el polipéptido puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil peptidasas.

El polinucleótido y polipéptido, incluyendo agonistas tiene usos que incluyen, pero no se limitan a conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, particularmente Arabidopsis. Alternativamente, los antagonistas dirigidos contra el polipéptido también pueden ser útiles en conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, en particular Arabidopsis y/o para incrementar la cantidad de compuestos almacenados en las semillas.

La farnesilación de la chaperona bacteriana DnaJ es esencial para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7). La farnesilación de estas chaperonas se requiere para su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, el ANJ1 es un homólogo del DnaJ y es inducido por tratamientos con calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 The Plant Cell 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación. El incremento en la farnesilación de las chaperonas de las plantas ha mostrado como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente lleva a una tolerancia incrementada al estrés en las plantas.

Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo los agonistas y/o fragmentos de las mismas tiene usos que incluyen conferir resistencia a estrés por calor, sequedad y sal en plantas. Alternativamente, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen modular una susceptibilidad de las plantas a tensiones bióticas y/o abióticas que incluyen, pero no se limitan a tensiones por calor, sequedad y sal en plantas. Preferiblemente los antagonistas de la presente divulgación incrementan una resistencia de las plantas al estrés por calor, sequedad y sal. La sobreexpresión del polipéptido de AtPrPasa1 de la presente divulgación como una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en la célula guardián, serían útiles para mejorar la tolerancia a la sequedad y la sal.

La farnesilación de las proteínas esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 PNAS 97: 7633-8). La mutación en los genes involucrados en la farnesilación de las plantas, ha saber la farnesil transferasa, da como resultado la inhibición de la proliferación celular en plantas de Arabidopsis (Bonetta et al. 2000 Planta 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación incrementada de las células, crecimiento incrementado de las plantas. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación que incluyen agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas, y potencialmente el rendimiento de las plantas, incrementándose preferiblemente el crecimiento de las plantas. Además, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas y/o del rendimiento, a través preferiblemente del incremento del crecimiento y rendimiento de las plantas. La sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa de la presente divulgación utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí) puede ser útil para incrementar el crecimiento de las plantas acelerando la división celular.

Aunque se cree que el polipéptido codificado puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil proteasas, se conocen en la técnica un cierto número para determinar la función biológica exacta de este clon o bien se describen en algún lugar aquí. Brevemente, la función de este clon puede determinarse aplicando una metodología de microarreglos. El clon AtPrPasa1, además de otros clones en la presente divulgación, puede ser dispuesto en microchips para perfiles de expresión. Dependiendo de que sonda de polinucleótidos utilizada para hibridar las lonjas, un cambio en expresión para un gen específico puede proveer una visión adicional en la función de este gen con base en las condiciones que están siendo estudiadas. Por ejemplo, un incremento o decremento observado en los niveles de expresión cuando en la sonda de polinucleótido usada viene de un tejido que ha sido tratado con frío podría indicar una función en la modulación de la tolerancia al frío, por ejemplo. En el caso de la AtPrPasa1, debería usarse un tejido privado de agua o tensionado por otras tensiones bióticas o abióticas (calor, sequedad, alta luminosidad, alta salinidad, etc.) para extraer el ARN para preparar la sonda.

Además, la función de la proteína puede establecerse aplicando metodología de PCR cuantitativo, por ejemplo, PCR cuantitativo en tiempo real que proporcionaría la capacidad de seguir la expresión de los genes específicos a través del ciclo de desarrollo de la planta, por ejemplo. La metodología de PCR cuantitativo requiere solamente una cantidad nominal de tejido de cada etapa importante del desarrollo (semillas germinadas de 3 días, semillas de una semana de edad [raíces, brotes y tallos]; raíces, hojas y tallos antes de la aparición de la florescencia, flores [partes diferentes]; y/o embriones en desarrollo) para llevar a cabo tales experimentos. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de PCR cuantitativo para refinar la función biológica de este polipéptido es abarcada por la presente divulgación. También se abarcan en la presente divulgación sondas de PCR cuantitativo correspondientes la secuencia de nucleótidos proporcionada como SEQ ID NO: 5(Figura 6).

La función de la proteína también puede establecerse a través de ensayos de complementación en levadura. Por ejemplo, en el caso del clon AtPrPasa2, la transformación de la levadura deficiente en la actividad de prenil proteasa, y el establecimiento de su capacidad para crecer proporcionaría evidencia convincente de que el clon de AtPrPas21 tiene actividad de prenil proteasa. Las condiciones y métodos de ensayo adicionales que pueden utilizarse para establecer la función de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se divulgan aquí en algún lugar.

Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede determinarse alterando un homólogo de este polipéptido en *Synecosystis*.

La cianobacterias (algas azul-verdes) se consideran precursoras de los cloroplastos vegetales. Posee ambos sistemas fotosintéticos y muchos otros procesos metabólicos que recuerdan a los de las plantas. Estos procesos frecuentemente son objetivo de muchos herbicidas comerciales, y este organismo ha sido usado ampliamente en el estudio del modo de acción de muchas clases de herbicidas. La *Synechocystis* es una de las cianobacterias mejor estudiadas.

Además de la mayor parte de las características comunes a las cianobacterias, ofrece muchas otras ventajas añadidas. La *Synechocystis* tiene un sistema de transformación genético de origen natural, que permite así una manipulación genética y molecular vigorosa y sofisticada (por ejemplo, perturbación apuntada a genes, reemplazo de genes, etc.) aplicable a algunos de los sistemas bien caracterizados (*S. cerevisiae*, *E. coli*). De forma más importante, la disponibilidad de la información de la secuencia genómica completa del *Synechocystis* permite un camino rápido para la identificación veloz y clonación del gen (o genes) de interés, y la elucidación de la función de los genes a través de medios genéticos y moleculares.

Adicionalmente, la función biológica de este polipéptido puede determinarse mediante la aplicación de metodología antisentido y/o sentido y la generación resultante de plantas transgénicas. La expresión de un gen en particular bien sea en orientación sentido o antisentido en una planta transgénica puede llevar respectivamente a niveles más altos a más bajos de expresión de ese gen. La alteración de los niveles de expresión endógenos de un gen puede conducir a la observación de un fenotipo particular que puede ser usado entonces para derivar indicaciones sobre la función del gen. El gen bien puede ser sobreexpresado o subexpresado en cada célula de la planta en todo momento utilizando un promotor ubicuo fuerte, o puede ser expresado en una o más partes discretas de la planta utilizando un promotor específico de un tejido bien caracterizado (esto es, un promotor de raíces o un promotor específico para flores o un promotor específico para semillas), o puede ser expresado en un tiempo especificado de desarrollo utilizando un promotor inducible y/o regulado por el desarrollo.

En el caso de *AtPrPasa2* de plantas transgénicas, si no hay un fenotipo evidente en condiciones normales de crecimiento, la observación de las plantas bajo condiciones de tensión (privación de agua, de presencia de alta salinidad u otras tenciones bióticas y abióticas, tales como frío, calor, sequedad, alta luminosidad, etc.) o el análisis bioquímico de semillas con almacenamiento de compuestos puede llevar al entendimiento de la función del gen. Por lo tanto, la aplicación de la metodología antisentido y/o sentido a la creación de plantas transgénicas para refinar la función biológica del polipéptido esta abarcada por la presente divulgación.

Los siguientes mutantes con eliminación de N-terminal son abarcados por la presente divulgación: M1-D424, A2-D424, I3-D424, P4-D424, F5-D424, M6-D424, E7-D424, T8-D424, V9-D424, V10-D424, GII-D424, F12-D424, M13-D424, I14-D424, V15-D424, M16-D424, Y17-D424, I18-D424, F19-D424, E20-D424, T21-D424, Y22-D424, L23-D424, D24-D424, L25-D424, R26-D424, Q27-D424, L28-D424, T29-D424, A30-D424, L31-D424, K32-D424, L33-D424, P34-D424, T35-D424, L36-D424, P37-D424, K38-D424, T39-D424, L40-D424, V41-D424, G42-D424, V43-D424, I44-D424, S45-D424, Q46-D424, E47-D424, K48-D424, F49-D424, E50-D424, K51-D424, S52-D424, R53-D424, A54-D424, Y55-D424, S56-D424, L57-D424, D58-D424, K59-D424, S60-D424, Y61-D424, F62-D424, H63-D424, F64-D424, V65-D424, H66-D424, E67-D424, F68-D424, V69-D424, T70-D424, I71-D424, L72-D424, M73-D424, D74-D424, S75-D424, A76-D424, I77-D424, L78-D424, F79-D424, F80-D424, G81-D424, I82-D424, L83-D424, P84-D424, W85-D424, F86-D424, W87-D424, K88-D424, M89-D424, S90-D424, G91-D424, A92-D424, V93-D424, L94-D424, P95-D424, R96-D424, L97-D424, G98-D424, L99-D424, D100-D424, P101-D424, E102-D424, N103-D424, E104-D424, I105-D424, L106-D424, H107-D424, T108-D424, L109-D424, S110-D424, F111-D424, L112-D424, A113-D424, G114-D424, V115-D424, M116-D424, T117-D424, W118-D424, S119-D424, Q120-D424, I121-D424, T122-D424, D123-D424, L124-D424, P125-D424, F126-D424, S127-D424, L128-D424, Y129-D424, S130-D424, T131-D424, F132-D424, V133-D424, I134-D424, E135-D424, S136-D424, R137-D424, H138-D424, G139-D424, F140-D424, N141-D424, K142-D424, Q143-D424, T144-D424, I145-D424, W146-D424, M147-D424, F148-D424, I149-D424, R150-D424, D151-D424, M152-D424, I153-D424, K154-D424, G155-D424, T156-D424, F157-D424, L158-D424, S159-D424, V160-D424, I161-D424, L162-D424, G163-D424, P164-D424, P165-D424, I166-D424, V167-D424, A168-D424, A169-D424, I170-D424, I171-D424, F172-D424, I173-D424, V174-D424, Q175-D424, K176-D424, G177-D424, G178-D424, P179-D424, Y180-D424, L181-D424, A182-D424, I183-D424, Y184-D424, L185-D424, W186-D424, A187-D424, F188-D424, M189-D424, F190-D424, I191-D424, L192-D424, S193-D424, L194-D424, V195-D424, M196-D424, M197-D424, T198-D424, I199-D424, Y200-D424, P201-D424, V202-D424, L203-D424, I204-D424, A205-D424, P206-D424, L207-D424, F208-D424, N209-D424, K210-D424, F211-D424, T212-D424, P213-D424, L214-D424, P215-D424, D216-D424, G217-D424, D218-D424, L219-D424, R220-D424, E221-D424, K222-D424, I223-D424, E224-D424, K225-D424, L226-D424, A227-D424, S228-D424, S229-D424, L230-D424, K231-D424, F232-D424, P233-D424, L234-D424, K235-D424, K236-D424, L237-D424, F238-D424, V239-D424, V240-D424, D241-D424, G242-D424, S243-D424, T244-D424, R245-D424, S246-D424, S247-D424, H248-D424, S249-D424, N250-D424, A251-D424, Y252-D424, M253-D424, Y254-D424, G255-D424, F256-D424, F257-D424, K258-D424, N259-D424, K260-D424, R261-D424, I262-D424, V263-D424, L264-D424, Y265-D424, D266-D424, T267-D424, L268-D424, I269-D424, Q270-D424, Q271-D424, C272-D424, K273-D424, N274-D424, E275-D424, D276-D424, E277-D424, I278-D424, V279-D424, A280-D424, V281-D424, I282-D424, A283-D424, H284-D424, E285-D424, L286-D424, G287-D424, H288-D424, W289-D424, K290-D424, L291-D424, N292-D424, H293-D424, T294-D424, T295-D424, Y296-D424, S297-D424, F298-D424, I299-D424, A300-D424, V301-D424, Q302-D424, I303-D424, L304-D424, A305-D424, F306-D424, L307-D424, Q308-D424, F309-D424, G310-

5 D424, G311-D424, Y312- D424, T313-D424, L314-D424, V315-D424, R316-D424, N317-D424, S318- D424, T319-D424, D320-D424, L321-D424, F322-D424, R323-D424, S324-D424, F325-D424, G326-D424, F327-D424, D328-D424, T329-D424, Q330-D424, P331- D424, V332-D424, L333-D424, I334-D424, G335-D424, L336-D424, I337-D424, I338-D424, F339-D424, Q340- D424, H341-D424, T342-D424, V343-D424, I344- D424, P345-D424, L346-D424, Q347-D424, H348-D424, L349-D424, V350-D424, S351-D424, F352-D424, G353-D424, L354-D424, N355-D424, L356-D424, V357- D424, S358-D424, R359-D424, A360-D424, F361-D424, E362-D424, F363-D424, Q364-D424, A365-D424, D366-D424, A367-D424, F368- D424, A369-D424, V370-D424, K371-D424, L372-D424, G373-D424, Y374-D424, A375-D424, K376-D424, D377-D424, L378-D424, R379-D424, P380-D424, A381-D424, L382-D424, V383- D424, K384-D424, L385-D424, Q386-D424, E387- D424, E388-D424, N389-D424, L390-D424, S391-D424, A392-D424, M393-D424, N394-D424, T395-D424, D396- D424, L397-D424, L398-D424, Y399-D424, S400-D424, A401-D424, Y402-D424, H403-D424, Y404-D424, S405-D424, H406-D424, P407-D424, P408-D424, L409-D424, V410-D424, E411-D424, R412-D424, L413-D424, R414-D424, A415-D424, I416-D424, D417-D424, G418-D424, de SEQ ID NO : 6. También se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

15 Los siguientes mutantes con eliminación de C-terminal son abarcados por la presente divulgación: M1-D424, M1-T423, M1-K422, M1-K421, M1-D420, M1-E419, M1-G418, M1-D417, M1-I416, M1-A415, M1-R414, M1- L413, M1-R412, M1- E411, M1-V410, M1-L409, M1-P408, M1-P407, M1-H406, M1-S405, M1-Y404, M1-H403, M1-Y402, M1-A401, M1- S400, M1-Y399, M1- L398, M1-L397, M1-D396, M1-T395, M1-N394, M1-M393, M1-A392, M1-S391, M1-L390, M1- N389, M1-E388, M1-E387, M1-Q386, M1-L385, M1-K384, M1-V383, M1-L382, M1-A381, M1-P380, M1-R379, M1- L378, M1-D377, M1-K376, M1-A375, M1-Y374, M1-G373, M1-L372, M1-K371, M1-V370, M1-A369, M1-F368, M1-A367, M1-D366, M1-A365, M1-Q364, M1-F363, M1-E362, M1-F361, M1-A360, M1-R359, M1-S358, M1-V357, M1-L356, M1- N355, M1-L354, M1- G353, M1-F352, M1-S351, M1-V350, M1-L349, M1-H348, M1-Q347, M1-L346, M1-P345, M1- I344, M1-V343, M1-T342, M1-H341, M1-Q340, M1-F339, M1-I338, M1-I337, M1-L336, M1-G335, M1-I334, M1-L333, M1-V332, M1-P331, M1-Q330, M1-T329, M1-D328, M1-F327, M1-G326, M1-F325, M1-S324, M1-R323, M1-F322, M1- L321, M1-D320, M1-T319, M1-S318, M1-N317, M1-R316, M1-V315, M1- L314, M1-T313, M1-Y312, M1-G311, M1- G310, M1-F309, M1-Q308, M1-L307, M1-F306, M1-A305, M1-L304, M1-I303, M1-Q302, M1-V301, M1-A300, M1-I299, M1-F298, M1-S97, M1-Y296, M1-T295, M1-T294, M1-H293, M1-N292, M1-L291, M1-K290, M1-W289, M1-H288, M1- G287, M1-L286, M1-E285, M1-H284, M1-A283, M1-I282, M1-V281, M1-A280, M1-V279, M1-I278, M1-E277, M1-D276, M1-E275, M1-N274, M1-K273, M1-C272, M1-Q271, M1-Q270, M1-I269, M1- L268, M1-T267, M1-D266, M1-Y265, M1- L264, M1-V263, M1-I262, M1-R261, M1-K260, M1-N259, M1-K258, M1-F257, M1-F256, M1-G255, M1-Y254, M1- M253, M1-Y252, M1-A251, M1-N250, M1-S249, M1-H248, M1-S247, M1-S246, M1-R245, M1-T244, M1-S243, M1-G242, M1- D241, M1-V240, M1-V239, M1- F238, M1-L237, M1-K236, M1-K235, M1-L234, M1-P233, M1-F232, M1-K231, M1- L230, M1-S229, M1-S228, M1-A227, M1-L226, M1-K225, M1-E224, M1-I223, M1-K222, M1-E221, M1-R220, M1-L219, M1-D218, M1-G217, M1-D216, M1- P215, M1-L214, M1-P213, M1-T212, M1-F211, M1-K210, M1-N209, M1-F208, M1- L207, M1-P206, M1-A205, M1-I204, M1-L203, M1-V202, M1-P201, M1-Y200, M1-I199, M1-T198, M1-M197, M1-M196, 5 M1-V195, M1-L194, M1-S193, M1- L192, M1-I191, M1-F190, M1-M189, M1-F188, M1-A187, M1-W186, M1-L185, M1- Y184, M1-I183, M1-A182, M1-L181, M1-Y180, M1-P179, M1-G178, M1- G177, M1-K176, M1-Q175, M1-V174, M1-I173, M1-F172, M1-I171, M1-I170, M1- A169, M1-A168, M1-V167, M1-I166, M1-P165, M1-P164, M1-G163, M1-L162, M1- I161, M1-V160, M1-S159, M1-L158, M1-F157, M1-T156, M1-G155, M1-K154, M1-I153, M1-M152, M1-D151, M1-R150, M1-I149, M1-F148, M1-M147, M1- W146, M1-I145, M1-T144, M1-Q143, M1-K142, M1-N141, M1-F140, M1-G139, M1- H138, M1-R137, M1-S136, M1-E135, M1-I134, M1-V133, M1-F132, M1-T131, M1-S130, M1-Y129, M1-L128, M1-S127, M1-F126, M1-P125, M1-L124, M1-D123, M1-T122, M1-I121, M1-Q120, M1-S119, M1-W118, M1-T117, M1-M116, M1- V115, M1-G114, M1-A113, M1-L112, M1-F111, M1-S110, M1-L109, M1-T108, M1-H107, M1-L106, M1-I105, M1-E104, M1-N103, M1-E102, M1-P101, M1-D100, M1-L99, M1-G98, M1-L97, M1-R96, M1-P95, M1-L94, M1-V93, M1-A92, M1- G91, M1-S90, M1-M89, M1-K88, M1-W87, M1-F86, M1-W85, M1-P84, M1-L83, M1-I82, M1-G81, M1-F80, M1-F79, M1- L78, M1-I77, M1-A76, M1-S75, M1-D74, M1-M73, M1-L72, M1-I71, M1-T70, M1-V69, M1-F68, M1-E67, M1-H66, M1- V65, M1-F64, M1-H63, M1-F62, M1-Y61, M1-S60, M1-K59, M1-D58, M1-L57, M1-S56, M1-Y55, M1-A54, M1-R53, M1- S52, M1-K51, M1-E50, M1-F49, M1-K48, M1- E47, M1-Q46, M1-S45, M1-I44, M1-V43, M1-G42, M1-V41, M1-L40, M1- T39, M1- K38, M1-P37, M1-L36, M1-T35, M1-P34, M1-L33, M1-K32, M1-L31, M1-A30, M1-T29, M1-L28, M1-027, M1- R26, M1-L25, M1-D24, M1-L23, M1-Y22, M1-T21, M1-E20, M1-F19, M1-I18, M1-Y17, M1-M16, M1-V15, M1-I14, M1- M13, M1-F12, M1-G11, M1-V10, M1-V9, M1-T8, M1-E7, de SEQ ID NO:6.

55 También se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Muchas secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias EST, son disponibles públicamente y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEQ ID NO: 5 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados están excluidos específicamente del alcance de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada sería engorroso. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente se excluyen de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita por la fórmula general de A-B, donde A es un entero entre 1 a 1275 de SEQ ID NO: 5, B es un entero entre 15 a 1275, donde tanto A como B corresponden a la posiciones de los residuos de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 5, y donde B es mayor igual o igual a +14.

65

Características del polipéptido codificado por el gen No: 4

- 5 El polipéptido de este gen provisto como SEQ ID NO:8 (Figura 9), codificado por la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 7 (Figura 8), AtPrPasa1, tiene homología significativa al nivel de nucleótidos y aminoácidos tanto para prenil peptidasas tanto humanas como de levadura (véase Figura 12 A-D), con base en la homología, el polipéptido puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil peptidasas.
- 10 El polinucleótido y polipéptido, incluyendo agonistas tiene usos que incluyen, pero no se limitan a conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, particularmente Arabidopsis. Alternativamente, los antagonistas dirigidos contra el polipéptido también pueden ser útiles en conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas, en particular Arabidopsis.
- 15 La farnesilación de la chaperona bacteriana DnaJ es esencial para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7). La farnesilación de estas chaperonas se requiere para su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, el ANJ1 es un homólogo del DnaJ y es inducido por tratamientos con calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 The Plant Cell 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación. El incremento en la farnesilación de las chaperonas de las plantas ha mostrado como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente lleva a una tolerancia incrementada al estrés en las plantas.
- 20 Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo los agonistas y/o fragmentos de las mismas tiene usos que incluyen conferir resistencia a estrés por calor, sequedad y sal en plantas. Alternativamente, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen modular una susceptibilidad de las plantas a tensiones bióticas y/o abióticas que incluyen, pero no se limitan a tensiones por calor, sequedad y sal en plantas. Preferiblemente los antagonistas de la presente divulgación incrementan una resistencia de las plantas al estrés por calor, sequedad y sal. La sobreexpresión del polipéptido de AtPrPasa1 de la presente divulgación como una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en la célula guardián, serían útiles para mejorar la tolerancia a la sequedad y la sal.
- 25 La sobreexpresión del polipéptido de PrPasa de la presente divulgación en una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo una proteína de semilla desconocida, USP, promotor), sería útil para incrementar la cantidad de compuestos almacenados en la semilla. Adicionalmente, los antagonistas de la presente invención pueden tener usos que incluyen la modulación de la cantidad de un compuesto almacenado en las semillas de una planta.
- 30 La farnesilación de las proteínas esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 PNAS 97: 7633-8). La mutación en los genes involucrados en la farnesilación de las plantas, ha saber la farnesil transferasa, da como resultado la inhibición de la proliferación celular en plantas (Bonetta et al. 2000 Planta 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación incrementada de las células, crecimiento incrementado de las plantas. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación que incluyen agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas, y potencialmente el rendimiento de las plantas, incrementándose preferiblemente el crecimiento de las plantas. Además, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas y/o del rendimiento, a través preferiblemente del incremento del crecimiento y rendimiento de las plantas. La sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa de la presente divulgación utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí) puede ser útil para incrementar el crecimiento de las plantas acelerando la división celular.
- 35 La sobreexpresión del polipéptido de PrPasa de la presente divulgación en una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo una proteína de semilla desconocida, USP, promotor), sería útil para incrementar la cantidad de compuestos almacenados en la semilla. Adicionalmente, los antagonistas de la presente invención pueden tener usos que incluyen la modulación de la cantidad de un compuesto almacenado en las semillas de una planta.
- 40 Aunque se cree que el polipéptido codificado puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil proteasas, se conocen en la técnica un cierto número para determinar la función biológica exacta de este clon o bien se describen en algún lugar aquí. Brevemente, la función de este clon puede determinarse aplicando una metodología de microarreglos. El clon AtPrPasa1, además de otros clones en la presente divulgación, puede ser dispuesto en microchips para perfiles de expresión. Dependiendo de que sonda de polinucleótidos utilizada para hibridizar las lonjas, un cambio en expresión para un gen específico puede proveer una visión adicional en la función de este gen con base en las condiciones que están siendo estudiadas. Por ejemplo, un incremento o decremento observado en los niveles de expresión cuando en la sonda de polinucleótido usada viene de un tejido que ha sido tratado con frío podría indicar una función en la modulación de la tolerancia al frío, por ejemplo. En el caso de la AtPrPasa1, debería usarse un tejido privado de agua o tensionado por otras tensiones bióticas o abióticas (calor, sequedad, alta luminosidad, alta salinidad, etc.) para extraer el ARN para preparar la sonda.
- 45 Además, la función de la proteína puede establecerse aplicando metodología de PCR cuantitativo, por ejemplo, PCR cuantitativo en tiempo real que proporcionaría la capacidad de seguir la expresión de los genes específicos a través del ciclo de desarrollo de la planta, por ejemplo. La metodología de PCR cuantitativo requiere solamente una cantidad nominal de tejido de cada etapa importante del desarrollo (semillas germinadas de 3 días, semillas de una semana de edad [raíces, brotes y tallos]; raíces, hojas y tallos antes de la aparición de la florescencia, flores [partes diferentes]; y/o embriones en desarrollo) para llevar a cabo tales experimentos. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de PCR cuantitativo para refinar la función biológica de este polipéptido es abarcada por la presente
- 50
- 55
- 60
- 65

divulgación. También se abarcan en la presente divulgación sondas de PCR cuantitativo correspondientes la secuencia de nucleótidos proporcionada como SEQ ID NO: 7(Figura 8).

5 La función de la proteína también puede establecerse a través de ensayos de complementación en levadura. Por ejemplo, en el caso del clon GmPrPasal, la transformación de la levadura deficiente en la actividad de prenil proteasa, y el establecimiento de su capacidad para crecer proporcionaría evidencia convincente de que el clon de GmPrPasal tiene actividad de prenil proteasa. Las condiciones y métodos de ensayo adicionales que pueden utilizarse para establecer la función de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se divulgan aquí en algún lugar.

10 Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede determinarse alterando un homólogo de este polipéptido en *Synechocystis*.

15 La cianobacterias (algas azul-verdes) se consideran precursoras de los cloroplastos vegetales. Posee ambos sistemas fotosintéticos y muchos otros procesos metabólicos que recuerdan a los de las plantas.

Estos procesos frecuentemente son objetivo de muchos herbicidas comerciales, y este organismo ha sido usado ampliamente en el estudio del modo de acción de muchas clases de herbicidas.

20 La *Synechocystis* es una de las cianobacterias mejor estudiadas. Además de la mayor parte de las características comunes a las cianobacterias, ofrece muchas otras ventajas añadidas.

25 La *Synechocystis* tiene un sistema de transformación genético de origen natural, que permite así una manipulación genética y molecular vigorosa y sofisticada (por ejemplo, perturbación apuntada a genes, reemplazo de genes, etc.) aplicable a algunos de los sistemas bien caracterizados (*S. cerevisiae*, *E. coli*). De forma más importante, la disponibilidad de la información de la secuencia genómica completa del *Synechocystis* permite un camino rápido para la identificación veloz y clonación del gen (o genes) de interés, y la elucidación de la función de los genes a través de medios genéticos y moleculares.

30 Adicionalmente, la función biológica de este polipéptido puede determinarse mediante la aplicación de metodología antisentido y/o sentido y la generación resultante de plantas transgénicas. La expresión de un gen en particular bien sea en orientación sentido o antisentido en una planta transgénica puede llevar respectivamente a niveles más altos a más bajos de expresión de ese gen. La alteración de los niveles de expresión endógenos de un gen puede conducir a la observación de un fenotipo particular que puede ser usado entonces para derivar indicaciones sobre la función del gen. El gen bien puede ser sobreexpresado o subexpresado en cada célula de la planta en todo momento utilizando un promotor ubicuo fuerte, o puede ser expresado en una o más partes discretas de la planta utilizando un promotor específico de un tejido bien caracterizado (esto es, un promotor de raíces o un promotor específico para flores o un promotor específico para semillas), o puede ser expresado en un tiempo especificado de desarrollo utilizando un promotor inducible y/o regulado por el desarrollo.

40 En el caso de GmPrPasal de plantas transgénicas, si no hay un fenotipo evidente en condiciones normales de crecimiento, la observación de las plantas bajo condiciones de tensión (privación de agua, de presencia de alta salinidad u otras tenciones bióticas y abióticas, tales como frío, calor, sequedad, alta luminosidad, etc.) o el análisis bioquímico de semillas con almacenamiento de compuestos puede llevar al entendimiento de la función del gen. Por lo tanto, la aplicación de la metodología antisentido y/o sentido a la creación de plantas transgénicas para refinar la función biológica del polipéptido esta abarcada por la presente divulgación.

50 En realizaciones preferidas, Los siguientes mutantes con eliminación de N-terminal son abarcados por la presente divulgación: M1-C400, A2-C400, F3-C400, P4-C400, Y5- C400, M6-C400, E7-C400, A8-C400, V9-C400, V10- C400, G11-C400, F12-C400, M13-C400, I14-C400, L15-C400, M16-C400, Y17-C400, I18-C400, F19-C400, E20- C400, T21-C400, Y22-C400, L23-C400, D24-C400, V25-C400, R26-C400, Q27- C400, H28-C400, R29-C400, A30-C400, L31-C400, K32-C400, L33-C400, P34- C400, T35-C400, L36-C400, P37-C400, K38-C400, T39-C400, L40-C400, E41-C400, G42-C400, V43-C400, I44-C400, S45-C400, Q46-C400, E47-C400, K48- C400, F49-C400, E50-C400, K51-C400, S52- C400, R53-C400, A54-C400, Y55- C400, S56-C400, L57-C400, D58-C400, K59-C400, S60-C400, H61-C400, F62- C400, H63-C400, F64-C400, V65-C400, H66-C400, E67-C400, F68-C400, V69- C400, T70-C400, I71-C400, V72-C400, T73-C400, D74-C400, S75-C400, T76-C400, I77-C400, L78-C400, Y79-C400, F80-C400, G81-C400, V82-C400, L83- C400, P84- C400, W85-C400, F86-C400, W87-C400, K88-C400, K89-C400, S90-C400, G91-C400, D92-C400, F93- C400, M94-C400, T95-C400, I96-C400, A97-C400, G98- C400, F99-C400, N100-C400, A101-C400, E102-C400, N103- C400, E104-C400, I105-C400, L106-C400, H107-C400, T108-C400, L109-C400, A110-C400, F111- C400, L112-C400, A113-C400, G114-C400, L115-C400, M116-C400, I117-C400, W 118-C400, S 119-C400, Q 120-C400, I121-C400, T122-C400, D123-C400, L124- C400, P125-C400, F126-C400, S127-C400, L128-C400, Y129-C400, S130-C400, T131- C400, F132-C400, V133-C400, I134-C400, E135-C400, A136-C400, R137- C400, H138-C400, G139-C400, F140-C400, N141-C400, K142-C400, Q143-C400, T144-C400, P145-C400, W146-C400, L147-C400, F148-C400, F149-C400, R150- C400, D'151-C400, M152-C400, L153-C400, K154-C400, G155-C400, I156-C400, F157-C400, L158-C400, S159-C400, V160-C400, I161-C400, I162-C400, G163- C400, P164-C400, P165-C400, I166-C400, V167-C400, A168- C400, A169-C400, I170-C400, I171-C400, V172-C400, I173-

5 C400, V174-C400, Q175-C400, K176- C400, G177-C400, G178-C400, P179-C400, Y180-C400, L181-C400, A182-  
C400, I183-C400, Y184-C400, L185-C400, W186-C400, V187- C400, F188-C400, T189-C400, F190-C400, G191-  
C400, L192-C400, S193-C400, I194-C400, V195-C400, M196-C400, M197-C400, T198-C400, L199-C400, Y200-  
C400, P201-C400, V202- C400, L203-C400, I204-C400, A205-C400, P206- C400, L207-C400, F208-C400, N209-  
C400, K210-C400, F211-C400, T212-C400, P213-C400, L214-C400, P215- C400, D216-C400, G217-C400, Q218-  
C400, L219-C400, R220-C400, E221-C400, K222-C400, I223-C400, E224-C400, K225- C400, L226-C400, A227-  
C400, S228- C400, N229-C400, L230-C400, N231-C400, Y232-C400, P233-C400, L234-C400, K235-C400, K236-  
C400, L237-C400, F238-C400, V239-C400, V240-C400, D241- C400, G242-C400, S243-C400, T244-C400, R245-  
C400, S246-C400, S247-C400, H248-C400, S249-C400, N250-C400, A251-C400, Y252-C400, M253-C400, Y254-  
10 C400, G255-C400, F256-C400, F257-C400, K258-C400, N259-C400, K260-C400, R261-C400, I262-C400, V263-  
C400, L264-C400, Y265-C400, D266-C400, T267- C400, L268-C400, I269-C400, Q270-C400, O271- C400, C272-  
C400, K273-C400, D274-C400, D275-C400, E276-C400, E277-C400, I278-C400, V279-C400, A280- C400, V281-  
C400, I282-C400, A283-C400, H284-C400, E285-C400, L286-C400, G287-C400, H288-C400, W289-C400, K290-  
C400, L291-C400, N292-C400, H293-C400, T294-C400, V295-C400, Y296-C400, T297-C400, F298-C400, V299-  
15 C400, A300-C400, M301-C400, Q302-C400, I303-C400, L304-C400, T305-C400, L306- C400, L307-C400, Q308-  
C400, F309- C400, G310-C400, G311-C400, Y312-C400, T313-C400, L314-C400, V315-C400, R316-C400, N317-  
C400, S318- C400, A319- C400, D320-C400, L321-C400, Y322-C400, R323-C400, S324-C400, F325-C400, G326-  
C400, F327- C400, D328-C400, T329-C400, Q330-C400, P331-C400, V332- C400, L333-C400, I334-C400, G335-  
C400, L336-C400, I337-C400, I338-C400, F339-C400, Q340-C400, H341-C400, T342-C400, V343-C400, I344-  
C400, P345- C400, L346- C400, Q347-C400, Q348-C400, L349-C400, V350-C400, S351-C400, F352-C400, G353-  
C400, L354-C400, N355- C400, L356-C400, V357-C400, S358- C400, R359-C400, S360-C400, F361-C400, E362-  
C400, F363-C400, Q364- C400, A365-C400, D366-C400, G367-C400, F368-C400, A369-C400, K370-C400, K371-  
C400, L372-C400, G373- C400, Y374-C400, A375-C400, S376-C400, G377-C400, L378-C400, R379-C400, G380-  
C400, G381-C400, L382- C400, V383-C400, K384- C400, L385-C400, Q386-C400, E387-C400, E388-C400, N389-  
20 C400, L390-C400, S391- C400, A392-C400, M393-C400, N394-C400, de SEQ ID NO : 8. También se proporcionan  
secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Los siguientes mutantes con eliminación de C-terminal son abarcados por la presente divulgación: M1-C400, M1-  
S399, M1-C398, M1-P397, M1-D396, M1-T395, M1-N394, M1-M393, M1-A392, M1-S391, M1-L390, M1- N389, M1-  
E388, M1-E387, M1-Q386, M1-L385, M1-K384, M1-V383, M1-L382, M1-G381, M1-G380, M1-R379, M1- L378, M1-  
G377, M1-S376, M1-A375, M1-Y374, M1-G373, M1-L372, M1-K371, M1-K370, M1-A369, M1-F368, M1- G367, M1-  
D366, M1-A365, M1-Q364, M1-F363, M1-E362, M1-F361, M1-S360, M1- R359, M1-S358, M1-V357, M1- L356, M1-  
N355, M1-L354, M1-G353, M1-F352, M1-S351, M1-V350, M1-L349, M1-Q348, M1-Q347, M1-L346, M1-P345, M1-  
I344, M1-V343, M1-T342, M1-H341, M1-Q340, M1-F339, M1-I338, M1-I337, M1-L336, M1-G335, M1-I334, M1-  
L333, M1-V332, M1-P331, M1-Q330, M1-T329, M1-D328, M1-F327, M1-G326, M1-F325, M1-S324, M1-R323, M1-  
Y322, M1-L321, M1- D320, M1-A319, M1-S318, M1-N317, M1-R316, M1-V315, M1-L314, M1-T313, M1-Y312, M1-  
G311, M1-G310, M1-F309, M1-Q308, M1-L307, M1-L306, M1- T305, M1-L304, M1-I303, M1-Q302, M1-M301, M1-  
A300, M1- V299, M1-F298, M1-T297, M1-Y296, M1-V295, M1-T294, M1-H293, M1-N292, M1-L291, M1- K290, M1-  
W289, M1- H288, M1-G287, M1-L286, M1-E285, M1-H284, M1-A283, M1-I282, M1-V281, M1-A280, M1-V279, M1-  
I278, M1-E277, M1-E276, M1-D275, M1-D274, M1-K273, M1-C272, M1-Q271, M1-Q270, M1-I269, M1-L268, M1-  
T267, M1-D266, M1- Y265, M1-L264, M1-V263, M1-I262, M1-R261, M1-K260, M1-N259, M1-K258, M1-F257, M1-  
F256, M1-G255, M1-Y254, M1-M253, M1- Y252, M1-A251, M1-N250, M1-S249, M1-H248, M1-S247, M1-S246, M1-  
R245, M1-T244, M1-S243, M1- G242, M1-D241, M1-V240, M1-V239, M1-F238, M1- L237, M1-K236, M1-K235, M1-  
L234, M1-P233, M1-Y232, M1- N231, M1-L230, M1-S229, M1-S228, M1-A227, M1-L226, M1-K225, M1-E224, M1-  
I223, M1-K222, M1-E221, M1-R220, M1-L219, M1-Q218, M1-G217, M1-D216, M1-P215, M1- L214, M1-P213, M1-  
T212, M1-F211, M1-K210, M1-N209, M1-  
45 F208, M1-L207, M1-P206, M1-A205, M1-I204, M1-L203, M1-V202, M1-P201, M1-Y200, M1-L199, M1-T198, M1-  
M197, M1-M196, M1-V195, M1-I194, M1-S193, M1-L192, M1- G191, M1-F190, M1-T189, M1-F188, M1-V187, M1-  
W186, M1- L185, M1-Y184, M1-I183, M1-A182, M1-L181, M1-Y180, M1-P179, M1-G178, M1-G177, M1-K176, M1-  
Q175, M1-V174, M1-I173, M1-V172, M1-I171, M1-I170, M1-A169, M1- A168, M1-V167, M1-I166, M1-P165, M1-P164,  
50 M1-G163, M1-I162, M1-I161, M1- V160, M1-S159, M1-L158, M1-F157, M1-I156, M1-G155, M1-K154, M1-L153, M1-  
M152, M1-D151, M1- R150, M1-F149, M1-F148, M1-L147, M1-W146, M1-P145, M1-T144, M1-Q143, M1-K142, M1-  
N141, M1-F140, M1- G139, M1-H138, M1- R137, M1-A136, M1-E135, M1-I134, M1-V133, M1-F132, M1-T131, M1-  
S130, M1- Y129, M1- L128, M1-S127, M1-F126, M1-P125, M1-L124, M1-D123, M1-T122, M1-I121, M1-Q120, M1-  
55 5119, M1-W118, M1-I117, M1-M116, M1-L115, M1-G114, M1-A113, M1-L112, M1-F111, M1-A110, M1-L109, M1-  
T108, M1-H107, M1-L106, M1- 1105, M1-E104, M1-N103, M1-E102, M1-A101, M1-N100, M1-F99, M1-G98, M1-A97,  
M1-196, M1-T95, M1-M94, M1- F93, M1-D92, M1-G91, M1-S90, M1-K89, M1-K88, M1-W87, M1-F86, M1-W85, M1-  
P84, M1-L83, M1-V82, M1- G81, M1-F80, M1-Y79, M1-L78, M1-I77, M1-T76, M1-S75, M1-D74, M1-T73, M1- V72,  
M1-I71, M1-T70, M1-V69, M1-F68, M1-E67, M1-H66, M1-V65, M1-F64, M1- H63, M1-F62, M1-H61, M1-S60, M1-  
K59, M1-D58, M1-L57, M1-S56, M1-Y55, M1-A54, M1-R53, M1-S52, M1-K51, M1-E50, M1-F49, M1-K48, M1-E47,  
60 M1- Q46, M1-S45, M1-I44, M1-V43, M1-G42, M1-E41, M1-L40, M1-T39, M1-K38, M1- P37, M1-L36, M1-T35, M1-  
P34, M1-L33, M1-K32, M1-L31, M1-A30, M1-R29, M1-H28, M1-Q27, M1-R26, M1-V25, M1-D24, M1-L23, M1-Y22,  
M1-T21, M1- E20, M1-F19, M1-118, M1-Y17, M1-M16, M1-L15, M1-114, M1-M13, M1-F12, M1- G11, M1-V10, M1-V9,  
M1-A8, M1-E7, of SEQ ID NO : 8. También se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican estos  
polipéptidos.

Muchas secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias EST, son disponibles públicamente y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEQ ID NO: 7 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados están excluidos específicamente del alcance de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada sería engorroso. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente se excluyen de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita por la fórmula general de A-B, donde A es un entero entre 1 a 1275 de SEQ ID NO: 7, B es un entero entre 15 a 1275, donde tanto A como B corresponden a la posiciones de los residuos de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 7, y donde B es mayor igual o igual a +14.

Características del polipéptido codificado por el gen No: 5

El polipéptido de este gen provisto como SEQ ID NO:10 (Figura 11), codificado por la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 9 (Figura 10), ZmtPrPasa1, tiene homología significativa al nivel de nucleótidos y aminoácidos tanto para prenil peptidasas tanto humanas como de levadura (véase Figura 12 A-D). Con base en la homología, el polipéptido puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil peptidasas. El polinucleótido y polipéptido, incluyendo agonistas tiene usos que incluyen, pero no se limitan a conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas. El polinucleótido también tiene usos que incluyen la identificación de ZmPrPasa1 de longitud completa. Alternativamente, los antagonistas dirigidos contra el polipéptido también pueden ser útiles en conferir tolerancia a la sequedad y/o tolerancia a la sal en plantas.

La farnesilación de la chaperona bacteriana DnaJ es esencial para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas (Wickner, S. et al 1991 Nature 350: 165-7). La farnesilación de estas chaperonas se requiere para su actividad completa. En la planta *Atriplex nummularia*, el ANJ1 es un homólogo del DnaJ y es inducido por tratamientos con calor y sal (Zhu, J.-K. et al 1993 The Plant Cell 5: 341-9). Esta enzima es un objetivo de la farnesilación. El incremento en la farnesilación de las chaperonas de las plantas ha mostrado como resultado una actividad biológica más alta de estas enzimas y consecuentemente lleva a una tolerancia incrementada al estrés en las plantas.

Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo los agonistas y/o fragmentos de las mismas tiene usos que incluyen conferir resistencia a estrés por calor, sequedad y sal en plantas. Alternativamente, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen modular una susceptibilidad de las plantas a tensiones bióticas y/o abióticas que incluyen, pero no se limitan a tensiones por calor, sequedad y sal en plantas. Preferiblemente los antagonistas de la presente divulgación incrementan una resistencia de las plantas al estrés por calor, sequedad y sal. La sobreexpresión del polipéptido de una tPrPasa de la presente divulgación como una planta que utiliza un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí), aunque no en la célula guardián, serían útiles para mejorar la tolerancia a la sequedad y la sal.

La farnesilación de las proteínas esta involucrada positivamente con el control del ciclo celular (Ziegelhoffer et al 2000 PNAS 97: 7633-8). La mutación en los genes involucrados en la farnesilación de las plantas, ha saber la farnesil transferasa, da como resultado la inhibición de la proliferación celular en plantas (Bonetta et al. 2000 Planta 211: 182-90). La sobreexpresión constitutiva en plantas de la ruta de farnesilación, ha saber de la prenil peptidasa, da como resultado una proliferación incrementada de las células, crecimiento incrementado de las plantas. Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación que incluyen agonistas y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas, y potencialmente el rendimiento de las plantas, incrementándose preferiblemente el crecimiento de las plantas. Además, los antagonistas de la presente divulgación pueden tener usos que incluyen la modulación del crecimiento de las plantas y/o del rendimiento, a través preferiblemente del incremento del crecimiento y rendimiento de las plantas. La sobreexpresión de un polipéptido de PrPasa de la presente divulgación utilizando un promotor constitutivo (por ejemplo, 35S, u otros promotores divulgados aquí) puede ser útil para incrementar el crecimiento de las plantas acelerando la división celular.

Aunque se cree que el polipéptido codificado puede compartir al menos algunas actividades biológicas con las prenil proteasas, se conocen en la técnica un cierto número para determinar la función biológica exacta de este clon o bien se describen en algún lugar aquí. Brevemente, la función de este clon puede determinarse aplicando una metodología de microarreglos. El clon ZmPrPasa1, además de otros clones en la presente divulgación, puede ser dispuesto en microchips para perfiles de expresión. Dependiendo de que sonda de polinucleótidos utilizada para hibridizar las lonjas, un cambio en expresión para un gen específico puede proveer una visión adicional en la función de este gen con base en las condiciones que están siendo estudiadas. Por ejemplo, un incremento o decremento observado en los niveles de expresión cuando en la sonda de polinucleótido usada viene de un tejido que ha sido tratado con frío podría indicar una función en la modulación de la tolerancia al frío, por ejemplo. En el caso de la ZmPrPasa1, debería usarse un tejido privado de agua o tensionado por otras tensiones bióticas o abióticas (calor, sequedad, alta luminosidad, alta salinidad, etc.) para extraer el ARN para preparar la sonda.

Además, la función de la proteína puede establecerse aplicando metodología de PCR cuantitativo, por ejemplo, PCR cuantitativo en tiempo real que proporcionaría la capacidad de seguir la expresión de los genes específicos a través del ciclo de desarrollo de la planta, por ejemplo. La metodología de PCR cuantitativo requiere solamente una

cantidad nominal de tejido de cada etapa importante del desarrollo (semillas germinadas de 3 días, semillas de una semana de edad [raíces, brotes y tallos]; raíces, hojas y tallos antes de la aparición de la florescencia, flores [partes diferentes]; y/o embriones en desarrollo) para llevar a cabo tales experimentos. Por lo tanto, la aplicación de la metodología de PCR cuantitativo para refinar la función biológica de este polipéptido es abarcada por la presente divulgación. También se abarcan en la presente divulgación sondas de PCR cuantitativo correspondientes la secuencia de nucleótidos proporcionada como SEQ ID NO: 9 (Figura 10).

La función de la proteína también puede establecerse a través de ensayos de complementación en levadura. Por ejemplo, en el caso del clon ZmPrPasal, la transformación de la levadura deficiente en la actividad de prenil proteasa, y el establecimiento de su capacidad para crecer proporcionaría evidencia convincente de que el clon de ZmPrPasal tiene actividad de prenil proteasa. Las condiciones y métodos de ensayo adicionales que pueden utilizarse para establecer la función de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se divulgan aquí en algún lugar.

Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede determinarse alterando un homólogo de este polipéptido en *Synechosystis*.

Alternativamente, la función biológica del polipéptido codificado puede determinarse alterando un homólogo de este polipéptido en *Synechosystis*.

La cianobacterias (algas azul-verdes) se consideran precursoras de los cloroplastos vegetales. Posee ambos sistemas fotosintéticos y muchos otros procesos metabólicos que recuerdan a los de las plantas. Estos procesos frecuentemente son objetivo de muchos herbicidas comerciales, y este organismo ha sido usado ampliamente en el estudio del modo de acción de muchas clases de herbicidas. La *Synechocystis* es una de las cianobacterias mejor estudiadas.

Además de la mayor parte de las características comunes a las cianobacterias, ofrece muchas otras ventajas añadidas. La *Synechosystis* tiene un sistema de transformación genético de origen natural, que permite así una manipulación genética y molecular vigorosa y sofisticada (por ejemplo, perturbación apuntada a genes, reemplazo de genes, etc.) aplicable a algunos de los sistemas bien caracterizados (*S. cerevisiae*, *E. coli*). De forma más importante, la disponibilidad de la información de la secuencia genómica completa del *Synechosystis* permite un camino rápido para la identificación veloz y clonación del gen (o genes) de interés, y la elucidación de la función de los genes a través de medios genéticos y moleculares.

Adicionalmente, la función biológica de este polipéptido puede determinarse mediante la aplicación de metodología antisentido y/o sentido y la generación resultante de plantas transgénicas. La expresión de un gen en particular bien sea en orientación sentido o antisentido en una planta transgénica puede llevar respectivamente a niveles más altos a más bajos de expresión de ese gen. La alteración de los niveles de expresión endógenos de un gen puede conducir a la observación de un fenotipo particular que puede ser usado entonces para derivar indicaciones sobre la función del gen. El gen bien puede ser sobreexpresado o subexpresado en cada célula de la planta en todo momento utilizando un promotor ubicuo fuerte, o puede ser expresado en una o más partes discretas de la planta utilizando un promotor específico de un tejido bien caracterizado (esto es, un promotor de raíces o un promotor específico para flores o un promotor específico para semillas), o puede ser expresado en un tiempo especificado de desarrollo utilizando un promotor inducible y/o regulado por el desarrollo.

En el caso de ZmPrPasal de plantas transgénicas, si no hay un fenotipo evidente en condiciones normales de crecimiento, la observación de las plantas bajo condiciones de tensión (privación de agua, de presencia de alta salinidad u otras tensiones bióticas y abióticas, tales como frío, calor, sequedad, alta luminosidad, etc.) o el análisis bioquímico de semillas con almacenamiento de compuestos puede llevar al entendimiento de la función del gen.

Por lo tanto, la aplicación de la metodología antisentido y/o sentido a la creación de plantas transgénicas para refinar la función biológica del polipéptido esta abarcada por la presente divulgación.

Los siguientes mutantes con eliminación de N-terminal son abarcados por la presente divulgación: T1-D329, R2-D329, L3-D329, S4-D329, A5-D329, E6-D329, N7-D329, E8-D329, I9-D329, I10-D329, H11-D329, T12-D329, L13-D329, A14-D329, F15-D329, L16-D329, A17-D329, G18-D329, S19-D329, M20-D329, V21-D329, W22-D329, S23-D329, Q24-D329, I25-D329, T26-D329, D27-D329, L28-D329, P29-D329, F30-D329, S31-D329, L32-D329, Y33-D329, S34-D329, T35-D329, F36-D329, V37-D329, I38-D329, E39-D329, A40-D329, R41-D329, H42-D329, G43-D329, F44-D329, N45-D329, K46-D329, Q47-D329, T48-D329, I49-D329, W50-D329, L51-D329, F52-D329, I53-D329, R54-D329, D55-D329, M56-D329, I57-D329, K58-D329, G59-D329, I60-D329, L61-D329, L62-D329, S63-D329, M64-D329, I65-D329, L66-D329, G67-D329, P68-D329, P69-D329, I70-D329, V71-D329, A72-D329, A73-D329, I74-D329, I75-D329, Y76-D329, I77-D329, V78-D329, Q79-D329, I80-D329, G81-D329, G82-D329, P83-D329, Y84-D329, L85-D329, A86-D329, I87-D329, Y88-D329, L89-D329, W90-D329, G91-D329, F92-D329, M93-D329, F94-D329, V95-D329, L96-D329, A97-D329, L98-D329, L99-D329, M100-D329, M101-D329, T102-D329, I103-D329, Y104-D329, P105-D329, I106-D329, V107-D329, I108-D329, A109-D329, P110-D329, L111-D329, F112-D329, N113-D329, K114-D329, F115-D329,

5 T116-D329, P117-D329, L118-D329, P119-D329, E120-D329, G121-D329, V122-D329, L123-D329, R124-D329, E125-D329, K126-D329, I127-D329, E128-D329, K129-D329, L130-D329, A131-D329, A132-D329, S133-D329, L134-D329, K135-D329, F136-D329, P137-D329, L138-D329, K139-D329, K140-D329, L141-D329, F142-D329, V143-D329, V144-D329, D145-D329, G146-D329, S147-D329, T148-D329, R149-D329, S150-D329, S151-D329, H152-D329, S153-D329, N154-D329, A155-D329, Y156-D329, M157-D329, Y158-D329, G159-D329, F160-D329, F161-D329, K162-D329, N163-D329, K164-D329, R165-D329, I166-D329, V167-D329, L168-D329, Y169-D329, D170-D329, T171-D329, L172-D329, I173-D329, Q174-D329, Q175-D329, C176-D329, S177-D329, N178-D329, E179-D329, D180-D329, E181-D329, I182-D329, V183-D329, S184-D329, V185-D329, I186-D329, A187-D329, H188-D329, E189-D329, L190-D329, G191-D329, H192-D329, W193-D329, K194-D329, L195-D329, N196-D329, H197-D329, T198-D329, V199-D329, Y200-D329, S201-D329, F202-D329, V203-D329, A204-D329, V205-D329, Q206-D329, L207-D329, L208-D329, M209-D329, F210-D329, L211-D329, Q212-D329, F213-D329, G214-D329, G215-D329, Y216-D329, T217-D329, L218-D329, V219-D329, R220-D329, S221-D329, S222-D329, K223-D329, D224-D329, L225-D329, F226-D329, G227-D329, S228-D329, F229-D329, G230-D329, F231-D329, K232-D329, D233-D329, Q234-D329, P235-D329, V236-D329, I237-D329, I238-D329, G239-D329, L240-D329, I241-D329, I242-D329, F243-D329, P244-D329, H245-D329, T246-D329, I247-D329, I248-D329, P249-D329, I250-D329, Q251-D329, H252-D329, L253-D329, L254-D329, S255-D329, F256-D329, R257-D329, L258-D329, N259-D329, L260-D329, V261-D329, S262-D329, R263-D329, A264-D329, F265-D329, E266-D329, F267-D329, Q268-D329, A269-D329, D270-D329, A271-D329, F272-D329, A273-D329, K274-D329, N275-D329, L276-D329, G277-D329, Y278-D329, A279-D329, P280-D329, Q281-D329, L282-D329, R283-D329, A284-D329, A285-D329, L286-D329, V287-D329, K288-D329, L289-D329, Q290-D329, E291-D329, E292-D329, N293-D329, L294-D329, S295-D329, A296-D329, M297-D329, N298-D329, T299-D329, D300-D329, P301-D329, W302-D329, Y303-D329, S304-D329, A305-D329, Y306-D329, H307-D329, Y308-D329, S309-D329, H310-D329, P311-D329, P312-D329, L313-D329, V314-D329, E315-D329, R316-D329, L317-D329, Q318-D329, A319-D329, L320-D329, E321-D329, D322-D329, S323-D329, of SEQ ID NO : 10. También se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

30 Los siguientes mutantes con eliminación de C-terminal son abarcados por la presente divulgación T1-D329, T1-E328, T1-K327, T1-K326, T1-D325, T1-D324, T1-S323, T1-D322, T1-E321, T1-L320, T1-A319, T1-Q318, T1-L317, T1-R316, T1-E315, T1-V314, T1-L313, T1-P312, T1-P311, T1-H310, T1-S309, T1-Y308, T1-H307, T1-Y306, T1-A305, T1-S304, T1-Y303, T1-W302, T1-P301, T1-D300, T1-T299, T1-N298, T1-M297, T1-A296, T1-S295, T1-L294, T1-N293, T1-E292, T1-E291, T1-Q290, T1-L289, T1-K288, T1-V287, T1-L286, T1-A285, T1-A284, T1-R283, T1-L282, T1-Q281, T1-P280, T1-A279, T1-Y278, T1-G277, T1-L276, T1-N275, T1-K274, T1-A273, T1-F272, T1-A271, T1-D270, T1-A269, T1-Q268, T1-F267, T1-E266, T1-F265, T1-A264, T1-R263, T1-S262, T1-V261, T1-L260, T1-N259, T1-L258, T1-R257, T1-F256, T1-S255, T1-L254, T1-L253, T1-H252, T1-Q251, T1-I250, T1-P249, T1-I248, T1-I247, T1-T246, T1-H245, T1-P244, T1-F243, T1-I242, T1-I241, T1-L240, T1-G239, T1-I238, T1-I237, T1-V236, T1-P235, T1-Q234, T1-D233, T1-K232, T1-F231, T1-G230, T1-F229, T1-S228, T1-G227, T1-F226, T1-L225, T1-D224, T1-K223, T1-S222, T1-S221, T1-R220, T1-V219, T1-L218, T1-T217, T1-Y216, T1-G215, T1-G214, T1-F213, T1-Q212, T1-L211, T1-F210, T1-M209, T1-L208, T1-L207, T1-Q206, T1-V205, T1-A204, T1-V203, T1-F202, T1-S201, T1-Y200, T1-V199, T1-T198, T1-H197, T1-N196, T1-L195, T1-K194, T1-W193, T1-H192, T1-G191, T1-L190, T1-E189, T1-H188, T1-A187, T1-I186, T1-V185, T1-S184, T1-V183, T1-I182, T1-E181, T1-D180, T1-E179, T1-N178, T1-S177, T1-C176, T1-Q175, T1-Q174, T1-I173, T1-L172, T1-T171, T1-D170, T1-Y169, T1-L168, T1-V167, T1-I166, T1-R165, T1-K164, T1-N163, T1-K162, T1-F161, T1-F160, T1-G159, T1-Y158, T1-M157, T1-Y156, T1-A155, T1-N154, T1-S153, T1-H152, T1-S151, T1-S150, T1-R149, T1-I148, T1-S147, T1-G146, T1-S145, T1-V144, T1-V143, T1-F142, T1-L141, T1-K140, T1-K139, T1-L138, T1-P137, T1-F136, T1-K135, T1-L134, T1-S133, T1-A132, T1-A131, T1-L130, T1-K129, T1-E128, T1-I127, T1-K126, T1-E125, T1-R124, T1-L123, T1-V122, T1-G121, T1-E120, T1-P119, T1-L118, T1-P117, T1-T116, T1-F115, T1-K114, T1-N113, T1-F112, T1-L111, T1-P110, T1-A109, T1-I108, T1-V107, T1-I106, T1-P105, T1-Y104, T1-I103, T1-T102, T1-M101, T1-M100, T1-L99, T1-L98, T1-A97, T1-L96, T1-V95, T1-F94, T1-M93, T1-F92, T1-G91, T1-W90, T1-L89, T1-Y88, T1-I87, T1-A86, T1-L85, T1-Y84, T1-P83, T1-G82, T1-G81, T1-I80, T1-Q79, T1-V78, T1-I77, T1-Y76, T1-I75, T1-I74, T1-A73, T1-A72, T1-V71, T1-I710, T1-P69, T1-P68, T1-G67, T1-L66, T1-I65, T1-M64, T1-S63, T1-L62, T1-L61, T1-I60, T1-G59, T1-K58, T1-I57, T1-M56, T1-D55, T1-R54, T1-T53, T1-F52, T1-L51, T1-W50, T1-I49, T1-T48, T1-Q47, T1-K46, T1-N45, T1-F44, T1-G43, T1-H42, T1-R41, T1-A40, T1-E39, T1-I38, T1-V37, T1-F36, T1-T35, T1-S34, T1-Y33, T1-L32, T1-S31, T1-F30, T1-P29, T1-L28, T1-D27, T1-T26, T1-I25, T1-Q24, T1-S23, T1-W22, T1-V21, T1-M20, T1-S19, T1-G18, T1-A17, T1-L16, T1-F15, T1-A14, T1-L13, T1-T12, T1-H11, T1-I10, T1-I9, T1-E8, T1-N7, of SEQ ID NO : 10. También se proporcionan secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

60 Muchas secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias EST, son disponibles públicamente y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEQ ID NO: 9 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados están excluidos específicamente del alcance de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada sería engorroso. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente se excluyen de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita por la fórmula general de A-B, donde A es un entero entre 1 a 1301 de SEQ ID NO: 9, B es un entero entre 15 a 1301, donde tanto A como B corresponden a la posiciones de los residuos de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 9, y donde B es mayor

igual o igual a +14.

5

Tabla 1

Gen No.	Clon CDNA ID	Deposito ATCC No. Z y	Vector	NT SEQ ID No.	Total NT Sec de Clon	5' NT de Codón de Inicio	3' NT de ORF	AA Sec ID No.	AA de ORF Total
1.	PpPrPasa1	Xxxxxx Xx/xx/xx	pCR2.1	1	1398	33	1214	2	394
2.	AtPrPasa1	Xxxxxx Xx/xx/xx	pCR2.1	3	1275	1	1272	4	424
3.	AtPrPasa2	Xxxxxx Xx/xx/xx	pCR2.1	5	1275	1	1272	6	424
4.	GmPrPasa1	Xxxxxx Xx/xx/xx	pCR2.1	7	1434	233	1272	8	400
5.	ZmPrPasa1	Xxxxxx Xx/xx/xx	pCR2.1	9	1301	1	987	10	329

La Tabla 1 resume la información correspondiente a cada "gen número" descrito anteriormente. La secuencia de nucleótidos identificada "NT SEQ ID NO: X" fue ensamblada a partir de secuencias homólogas parcialmente ("superpuesta") obtenidas a partir del "clon de ADNc ID" identificado en la tabla 1 y, en algunos casos, a partir de clones de ADN relacionados adicionales. Las secuencias de superposición fueron ensambladas en una secuencia contigua simple de alta redundancia (usualmente varias secuencias superponiéndose en cada posición de nucleótidos), dando como resultado una secuencia final identificada como SEQ ID NO: X.

10

Solamente aquellas secuencias de la lista de secuenciación identificadas en las reivindicaciones son parte de la presente invención. pCR2.1 fue obtenida de Invitrogen, Inc.

15

"Sec Total NT de Clon" se refiere al número total de nucleótidos en el conteo de clon identificado por "gen número". El clon puede contener todas o la mayor parte de las secuencias de SEQ ID NO: X. La posición del nucleótido de SEQ ID NO: X del codón de inicio putativo (metionina) se identifica como "5' NT del Codón de Inicio de ORF". La secuencia de aminoácidos traducida, que comienza con la metionina se identifica con "AA SEQ ID NO: Y", aunque otros marcos de lectura también pueden traducirse fácilmente utilizando técnicas de biología molecular conocidas. Los polipéptidos producidos por estos marcos de lectura abiertos alternativos son contemplados específicamente en la presente invención.

20

El número total de aminoácidos dentro del marco de lectura abierto de SEQ ID NO: Y se identifica como "Total AA de ORF".

25

SEQ ID NO: X (donde X puede ser cualquiera de las secuencias de polinucleótidos divulgadas en la lista de secuencia) y la SEQ ID NO: Y traducida (donde Y puede ser cualquier de las secuencias de polipéptidos divulgadas en el listado de secuencias) son suficientemente exactos y de otra forma adecuados para una variedad de usos bien conocidos en la técnica y descritos más adelante. Por ejemplo, SEQ ID NO: X es útil para diseñar sondas de hibridación de ácidos nucleicos que detecten secuencias de ácidos nucleicos contenidas en SEQ ID NO: X. Estas sondas también hibridizan a moléculas de ácidos nucleicos en muestras biológicas, permitiendo por lo tanto una variedad de métodos forenses y de diagnóstico de la divulgación. De la misma forma, los polipéptidos identificados de SEQ ID NO: Y pueden utilizarse, por ejemplo, para generar anticuerpos que se enlazan específicamente a proteínas que contienen los polipéptidos y las proteínas codificadas por los clones de ADNc identificados en la Tabla 1. No obstante, las secuencias de ADN generadas por las reacciones de secuenciación pueden contener errores de secuenciación. Los errores existen como nucleótidos mal identificados, o como insertos o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de ADN generada. Los nucleótidos insertados o eliminados erróneamente pueden causar desplazamientos en los marcos de lectura de la secuencia de aminoácidos predicha. En estos casos, la secuencia de aminoácidos predicha diverge de la secuencia de aminoácidos real, aun cuando la secuencia de ADN generada pueda ser más de 99.9% idéntica a la secuencia de ADN real (por ejemplo, una inserción o eliminación de una base en un marco de lectura abierto sobre 1000 bases).

30

35

5 También se proporcionan en la presente divulgación especies homólogas, variantes alélicas y/o ortólogos. El especialista experimentado podría, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, obtener la secuencia de polinucleótidos correspondientes a los genes de longitud completa (incluyendo, pero no limitándose a la región de codificación de longitud completa), variantes alélicas, variantes de seccionamiento, ortólogos y/o homólogos de especies de genes correspondientes a SEQ ID NO: X, SEQ ID NO: Y, o un clon, con base en la secuencia de las secuencias divulgadas aquí o de los clones de las mismas. Por ejemplo, las variantes alélicas y/o especies homólogas pueden aislarse e identificarse haciendo sondas o cebadores adecuados que correspondan con las regiones 5', 3' o internas de las secuencias provistas aquí y seleccionando una fuente adecuada de ácido nucleico para las variantes alélicas y/o el homólogo deseado.

10 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos aislados de origen natural, polipéptidos producidos de forma recombinante, polipéptidos producidos sintéticamente, o polipéptidos producidos por una combinación de estos métodos. Los medios para preparar tales polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden estar en la proteína, o pueden ser una parte de una proteína objetivo, tal como una proteína de fusión (véase más abajo). Frecuentemente es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretoras o guía, prosecretoras, secuencias que ayudan a la purificación, tales como residuos múltiples de histidina, o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción del recombinante.

15 Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente de una forma aislada, y preferiblemente se purifican de forma sustancial. Una versión producida de forma recombinante de un polipéptido puede ser purificada sustancialmente utilizando técnicas descritas aquí o de otra forma conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, por el método de una etapa descrito en Smith and Johnson, Gene 67: 31-40 (1988). Los polipéptidos de la invención también pueden purificarse a partir de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes utilizando protocolos descritos aquí o conocidos de alguna otra forma en la técnica, tales como, por ejemplo, anticuerpos de la invención surgidos contra la forma de longitud completa de la proteína. En las siguientes páginas SEQ ID NO: X significa SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: Y significa SEQ ID NO: 8.

20 La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende, o alternativamente consiste de, la secuencia identificada como SEQ ID NO: X. La presente invención también proporciona un polipéptido que comprende, o alternativamente consiste de, la secuencia identificada como SEQ ID NO: Y. La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende, o alternativamente consiste de la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: Y.

25 Un polinucleótido puede comprender, o alternativamente consistir de, la secuencia identificada como SEQ ID NO: X, esto es menos de, o igual a, una secuencia de polinucleótidos que tiene 5 megapares de bases, un megapar de bases, 0.5 megapares de bases, 0.1 megapares de bases, 50000 megapares de bases, 20000 megapares de bases o 10000 pares de bases de longitud.

30 La presente invención abarca polinucleótidos con secuencias complementarias a aquellas de los polinucleótidos de la presente invención divulgados aquí. Tales secuencias pueden ser complementarias a la secuencia divulgada como SEQ ID NO: X y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia divulgada como SEQ ID NO: Y.

La presente invención también abarca polinucleótidos capaces de hibridizar bajo condiciones restrictivas, y preferiblemente bajo condiciones altamente restrictivas, a polinucleótidos divulgados aquí.

35 Ejemplos de condiciones de restricción se muestran en la Tabla 2: las condiciones altamente restrictivas son aquellas que son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones A-F; las condiciones restrictivas son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones G-L; y las condiciones de restricción reducida son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

Tabla 2

Condición de restricción	Híbrido ± de polinucleótido	Longitud de Híbrido (bp) ‡	Temperatura y de Regulador y de Hibridización †	Temperatura y de Regulador y de Lavado †
A	ADN:ADN	> o igual que 50	65°C; 1xSSC o 42°C; 1xSSC, 50% formamida	65°C; 0.3xSSC

45

B	ADN:ADN	< 50	Tb*; 1xSSC	Tb*; 1xSSC
C	ADN:ARN	> o igual que 50	67°C; 1xSSC o 45°C; 1xSSC, 50% formamida	67°C; 0.3xSSC
D	ADN:ARN	< 50	Td*; 1xSSC	Td*; 1xSSC
E	ADN:ADN	> o igual que 50	65°C; 1xSSC o 42°C; 1xSSC, 50% formamida	65°C; 0.3xSSC
F	ADN:ADN	< 50	Tb*; 1xSSC	Tb*; 1xSSC
G	ARN:ARN	> o igual que 50	65°C; 4xSSC o 45°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
H	ADN:ADN	< 50	Th*; 4xSSC	Th*; 4xSSC
I	ADN:ARN	> o igual que 50	67°C; 4xSSC o 45°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
J	ADN:ARN	< 50	TJ*; 4xSSC	TJ*; 4xSSC
K	ARN:ARN	> o igual que 50	70°C; 4xSSC o 40°C; 6xSSC, 50% formamida	67°C; 0.3xSSC
L	ARN:ARN	< 50	TI*; 2xSSC	TI*; 2xSSC
M	ADN:ADN	> o igual que 50	50°C; 4xSSC o 40°C; 6xSSC, 50% formamida	50°C; 2xSSC
N	ADN:ADN	< 50	Tn*; 6xSSC	Tn*; 6xSSC
O	ADN:ARN	> o igual que 50	55°C; 4xSSC o 42°C; 6xSSC, 50% formamida	55°C; 2xSSC
P	ADN:ARN	< 50	Tp*; 6xSSC	Tp*; 6xSSC
Q	ARN:ARN	> o igual que 50	60°C; 4xSSC o 45°C; 6xSSC, 50% formamida	60°C; 2xSSC
R	ARN:ARN	< 50	Tr*; 4xSSC	Tr*; 4xSSC

‡: la "longitud de híbrido" es la longitud a anticipada para las regiones hibridizadas de los polinucleótidos que hibridizan. Cuando se hibridiza un polinucleótido de secuencia desconocida, se asume que el híbrido es el del tal polinucleótido hibridizante de la presente invención. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridizan, la longitud híbrida puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad óptima de la secuencia. Los métodos de alineamiento de dos o más secuencias de polinucleótidos y/o determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, MegAlign de la suite DNA\*Star de programas, etc.).

†: SSPE (1xSSPE es NaCl 0.15M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, y EDTA 1.25mM, pH 7.4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es NaCl 0.15M y citrato de sodio 15mM) en los reguladores de hibridización y lavado; los lavados son llevados a cabo durante 15 minutos después de que terminan la hibridización. Las hibridizaciones y lavados pueden incluir adicionalmente reactivo de Denhardt's 5X, SDS 5-1.0%, ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 100 µg/ml, pirofosfato de sodio 0.5% y hasta 50% en formamida.

\*Tb – Tr: la temperatura de hibridización para híbridos anticipada para ser menos de 50 pares de bases en longitud debería estar a 5-10°C en otra temperatura de fusión T<sub>m</sub> de los híbridos. Allí T<sub>m</sub> se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares de bases en longitud, T<sub>m</sub> (°C) = 2 (# de A + T bases) + 4 (# de G + C bases). Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases en longitud, 81.5 + 16.6(log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0.41(%G+C) - (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, [Na<sup>+</sup>] es la concentración de iones sodio en el regulador de hibridización ([Na<sup>+</sup>] de 1xSSC = .165 M).

±: La presente invención abarca la sustitución de cualquiera, o más asociados híbridos de ADN o ARN bien sea con PNA, o un polinucleótido modificado. Tales polinucleótidos modificados son conocidos en la técnica y se describen más particularmente en otro lugar aquí.

Ejemplos adicionales de condiciones de restricción para hibridización de polinucleótidos se proporcionan, por ejemplo, en Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M., Ausubel et al., eds, John Wiley and Sons, Inc., secciones 2.10 and 6.3-6.4.

La inversión abarca la aplicación de la metodología de PCR a las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y/o la codificación de ADNc de polipéptidos de la presente invención. Las técnicas de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos se describen en la patente de los Estados Unidos 4,683,195 y Saiki et al., *Science*, 239: 487-491 (1988). El PCR, por ejemplo, puede incluir las siguientes etapas, de desnaturalización del ácido nucleico patrón (si es de doble cadena), el anillamiento del cebador al objetivo y la polimerización. El ácido nucleico probado o utilizado como patrón en la reacción de amplificación puede ser ADN genómico, ADNc, ARN, o un PNA. El PCR puede utilizarse para amplificar secuencias específicas del ADN genómico, secuencias específicas de ARN, y/o ADNc transcrito desde ARNm. Referencias para el uso general de las técnicas de PCR, incluyendo los parámetros del método específico, incluyen Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263, (1987), Ehrlich (ed), *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989; Ehrlich et al., *Science*, 252: 1643-1650. (1991); and "PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", Eds., Innis et al., Academic Press, New York, (1990).

#### Secuencias de Señal

La presente invención también abarca formas maduras del polipéptido que comprende, o alternativamente consistente, la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: Y, el polipéptido codificado por los nucleótidos como se define en las reivindicaciones. La presente invención también abarca polinucleótidos que codifican formas maduras de la presente invención, tales como, por ejemplo la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: X.

De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por las células eucarióticas tienen una secuencia de señal o guía secretora que es escindida de la proteína madura una vez que la exportación de la proteína de crecimiento a través del retículo endoplásmico crudo ha sido iniciada. La mayoría de las células eucarióticas escinden las proteínas secretadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la decisión de la proteína secretada no es completamente uniforme, lo que da como resultado dos o más especies maduras de la proteína. Adicionalmente se ha sabido durante mucho tiempo que la especificidad de escisión de una proteína secretada está determinada finalmente por la estructura primaria la proteína completa, esto es, inherente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Hay disponibles métodos para predecir si una proteína tiene secuencia de señal, así como el punto de escisión para secuencia. Por ejemplo, el método de McGeoch, *Virus Res.* 3: 271-286 (1985), usa la información a partir de una región cargada N terminal y una región subsecuente no cargada de la proteína completa (no escindida). El método de von

Heinje, *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690 (1986) usa la información de los residuos que rodean el sitio de escisión, típicamente residuos -13 a +2, donde +1 indica el término amino de la proteína secretada. La exactitud de la predicción de los puntos de escisión de las proteínas secretadas de mamíferos conocidas para cada uno estos métodos está en el rango de 75 -80% (von Heinje, supra.). Sin embargo, los dos métodos no siempre producen el mismo punto de escisión predicho para una proteína.

El método establecido para identificar la localización de las secuencias de señal, además, de sus sitios de escisión ha sido el programa Signal (v1.1) es desarrollado por Henrik Nielsen et al., *Protein Engineering* 10: 1-6 (1997). El programa se basa en un algoritmo desarrollado por von Heinje, aunque proporciona parámetros adicionales para incrementar la exactitud de la predicción.

Más recientemente, se ha desarrollado un modelo de ocultación de Markov (H. Neilson, et al., *Ismb* 1998; 6: 122-30), el cual ha sido incorporado en el más reciente SignalP (v2.0). Este nuevo método incrementa la capacidad para identificar el sitio de escisión discriminando entre los péptidos de señal y las anclas de señal escindidas. La presente divulgación abarca la aplicación del método divulgado aquí para la predicción de la localización del péptido de señal, incluyendo el sitio de escisión, a cualquiera de las secuencias de polipéptidos de la presente invención.

Como será evidente para cualquier persona experimentada en la técnica, sin embargo, los sitios de escisión algunas veces varían de organismo a organismo y no pueden ser predichos con absoluta certeza. De acuerdo con lo anterior, el polipéptido de la presente invención puede contener una secuencia señal. Los polipéptidos de la invención que comprende una secuencia señal tiene un término N que comienza con cinco residuos (esto es, +0-5 residuos, o preferiblemente en el residuo -5,-4,-3,-2,-1, +1, +2, +3, +4, o +5) del punto de escisión predicho. De la misma forma, también se reconoce que en algunos casos, la escisión de la secuencia de señal de una proteína

secretada no es completamente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos, y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, se contemplan dentro de la presente invención.

5 Adicionalmente, la secuencia de señal identificada por el análisis anterior puede no necesariamente predecir la secuencia de señal de origen natural. Por ejemplo, la secuencia de señal de origen natural puede estar adicionalmente arriba de la secuencia de señal. Sin embargo, es probable que la secuencia de señal predicha sea capaz de dirigir la proteína secretada al ER.

10 No obstante, la presente invención proporciona la proteína madura producida por expresión de la secuencia de polinucleótidos como se define en las reivindicaciones en una célula de mamífero (por ejemplo, células COS, como se describe más abajo).

15 Estos polipéptidos, y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos están contemplados dentro de la presente invención.

#### Variantes de Polinucleótidos y Polipéptidos

20 La presente invención también abarca variantes (por ejemplo, variantes alélicas, ortólogos, etc.) de la secuencia de polinucleótidos divulgada aquí en SEQ ID NO: X y/o de la cadena complementaria de la misma.

La presente invención también abarca variantes de la secuencia de polipéptidos y/o fragmentos en la misma, divulgados en SEQ ID NO: Y.

25 "Variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido de la presente invención, pero que mantiene las propiedades esenciales del mismo. En general, las variantes son globalmente muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido de la presente invención.

30 La presente invención también se dirige a secuencias de polinucleótidos que comprenden, o alternativamente consisten de, una secuencia de polinucleótidos que es al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los siguientes ejemplos no limitantes, la secuencia de polinucleótidos de la región codificadora de la secuencia de SEQ ID NO: X, la cadena complementaria de dicha región de codificación de una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido identificado como SEQ ID NO: Y.

35 La presente invención también abarca secuencias de polinucleótidos que hibridizan a la complementaria de cualquiera de las secuencias de nucleótidos provistas de la presente invención bajo condiciones de hibridación restrictivas. Los polipéptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos que hibridizan las secuencias de polinucleótidos de la presente invención también son abarcadas por la presente invención.

40 La presente invención abarca secuencias de polipéptidos que comprenden, o alternativamente consisten de, una secuencia de aminoácidos con al menos 70%, 80%, 98%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a, el siguiente ejemplo no limitado, la secuencia de polipéptidos identificada como SEQ ID NO: Y.

45 Por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95% "idénticas" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico es igual a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de al menos 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta 5% del total de nucleótidos en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia seguida. La secuencia investigada puede ser una secuencia completa referenciada en la Tabla 1, el ORF (marco de lectura abierto), o cualquier fragmento especificado como se describe aquí.

55 Como un asunto práctico, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido en particular es al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede determinarse en forma convencional utilizando programas de ordenador conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia investigada (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeta, también denominada como alineamiento de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa de ordenador CLUSTALW (Thompson, J. D., et al., Nucleic Acids Research, 2 (22): 4673-4680, (1994)), el cual se basa en el algoritmo de Higgins, D. G., et al., Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 8 (2): 189-191, (1992). En un alineamiento de secuencia las secuencias investigada y sujeta son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede ser comparada convirtiendo Us a Ts. Resultado de tal alineamiento de secuencia global está en identidad porcentual.

65 Parámetros preferidos utilizados en un alineamiento CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular identidad porcentual son: matriz=BLOSUM, k-tuple=1, número de diagonales máximas = 5, penalidad por brecha =3, penalidad

abierta de derecha = 10, penalidad de extensión de brecha=0, método de marcación = porcentual, tamaño de ventana = 5 a la secuencia nucleótidos sujeto, la que sea más corta.

5 Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia investigada por eliminaciones de 5' o 3', no debido a  
 10 eliminaciones internas, debe hacerse una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa  
 CLUSTALW no cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando calcula la identidad porcentual. Para  
 15 secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia investigada, la identidad porcentual  
 es corregida calculando el número de bases de la secuencia investigada que son 5' y 3' de la secuencia sujeto, las  
 cuales no coinciden/se alinean, como porcentaje de las bases totales de la secuencia investigada. Si se determina  
 que un nucleótido coincide/se alinea debido a los resultados de alineación de secuencia CLUSTALW. Este  
 porcentaje es sustraído entonces de la identidad porcentual, calculada por el programa anterior CLUSTALW  
 utilizando los parámetros establecidos para llegar a un marcador final de identidad porcentual. Este marcador  
 corregido es el que puede ser utilizado para los propósitos de la presente invención. Solamente las bases por fuera  
 de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, tal como son presentadas por el alineamiento CLUSTALW, que no  
 coinciden/se alinean con la secuencia investigada, se calculan para el propósito de ajustar manualmente el  
 marcador de identidad porcentual.

20 Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases se alinea con una secuencia investigada de 100 bases para  
 determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones ocurren en el extremo 5' de la secuencia sujeto y por lo  
 tanto, el alineamiento CLUSTALW no muestra una coincidencia/alineamiento de las primeras 10 bases en el  
 extremo 5'. Las 10 bases no pareadas representan 10% de la secuencia (número de bases los extremos 5' y 3' que  
 no coinciden con el número total de bases con el número total de bases de la secuencia investigada), de manera  
 que sustrae 10% del marcador de identidad porcentual calculado por el programa CLUSTALW. Si las 90 bases  
 25 restantes coincidieran perfectamente la identidad porcentual final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto  
 de 90 bases es comparada con una secuencia investigada de 100 bases.

30 Este tipo de eliminaciones son eliminaciones internas de manera que no hay bases sobre la 3' o 5' de la secuencia  
 sujeto que no coincidan/se alineen con la investigada. En este caso la identidad porcentual calculada por  
 CLUSTALW no se corrige manualmente. Una vez de nuevo, solamente las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que  
 no coinciden/se alinean con la secuencia investigada se corrige manualmente. No se requieren otras correcciones  
 manuales para los propósitos de la presente invención.

35 Por un polipéptido que tiene una secuencia aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idénticas" a una secuencia  
 aminoácidos investigada de la presente invención, se entiende que a la secuencia aminoácidos del polipéptido  
 sujeto es idéntica a la secuencia investigada excepto que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta  
 cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos investigada. En otras  
 palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia  
 40 de aminoácidos investigada, hasta 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia sujeto pueden insertarse,  
 eliminarse o sustituirse con otro aminoácido. Esas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las  
 posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre estas  
 posiciones terminales, intercaladas bien sea individualmente entre residuos de la secuencia referencia o en uno o  
 más grupos contiguos dentro de la secuencia referencia.

45 Como asunto práctico, si cualquier polipéptido en particular es al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,  
 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, una secuencia aminoácidos referenciada en la Tabla 1  
 (SEQ ID NO: Y) puede determinarse convencionalmente utilizando programas de ordenador conocidos. Un método  
 preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia investigada (una secuencia de la  
 presente invención) y una secuencia sujeto, también denominada como alineamiento de secuencia global, puede  
 50 determinarse utilizando el programa de ordenador CLUSTALW (Thompson, J. D., et al., NucleicAcids Research, 2  
 (22): 4673-4680, (1994)), la cual se basa en el algoritmo de Higgins Higgins, D. G., et al., Computer Applications in  
 the Biosciences (CABIOS), 8 (2): 189-191, (1992). En un alineamiento de secuencia las secuencias investigada y  
 sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede ser comparada convirtiendo Us a Ts.  
 Resultado de tal alineamiento de secuencia global está en identidad porcentual.

55 Parámetros preferidos utilizados en un alineamiento CLUSTALW secuencias de ADN para calcular identidad  
 porcentual son: matriz=BLOSUM, k-tuple=l, número de diagonales máximas = 5, penalidad por brecha =3, penalidad  
 abierta de derecha = 10, penalidad de extensión de brecha=0, método de marcación = porcentual, tamaño de  
 ventana = 5 a la secuencia nucleótidos sujeto, la que sea más corta.

60 Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia investigada debido a eliminaciones N o C terminales no por  
 eliminaciones internas, debe hacerse una corrección manual a los resultados.

65 Esto es debido a que el programa CLUSTALW no cuenta los truncamientos N y C terminales de la secuencia sujeto  
 cuando se calcula la identidad porcentual global. Para secuencias sujeto truncadas en los términos N y C, con  
 respecto a la secuencia investigada, la identidad porcentual se corrige calculando el número de residuos de la  
 secuencia investigada que son N y C terminales de la secuencia sujeto, los cuales no coinciden/se alinean con un

- correspondiente residuo sujeto, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia investigada. Si un residuo coincide/ se alinea se determina como resultado del alineamiento de la secuencia CLUSTALW. Este porcentaje se sustrae entonces de la identidad porcentual, calculada por el programa CLUSTALW anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a un marcador de identidad porcentual final. Este marcador de identidad porcentual final puede ser utilizado para los propósitos de la presente invención. Solamente los residuos en los términos N y C de la secuencia sujeto, que no coinciden/se alinean con la secuencia investigada, se considera para los propósitos de ajustar manualmente el marcador de identidad porcentual. Esto es, solamente las posiciones de residuos investigados por fuera de los residuos terminales N y C más lejanos de la secuencia sujeto.
- Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos de aminoácidos se alinea con una secuencia investigada de 100 residuos para determinar la identidad porcentual. La eliminación ocurre en el término N de la secuencia sujeto, y por lo tanto, el alineamiento CLUSTALW no muestra una coincidencia/alineamiento en los primeros 10 residuos en el término N. Los 10 residuos no pareados representan 10% de la secuencia (número de residuos en los términos N y C no alineados/número total de residuos en la secuencia investigada) de manera que se sustrae 10% del marcador de identidad porcentual calculado por el programa CLUSTALW. Si los 90 residuos restantes coincidieran perfectamente la identidad porcentual final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos se compara con una secuencia investigada de 100 residuos. Esta vez las eliminaciones son eliminaciones internas de manera que no hay residuos en los que los términos N o C de la secuencia sujeto, que no coincidan/se alineen con la investigada. En este caso la identidad porcentual calculada por CLUSTALW no se corrige manualmente. Una vez más, solamente las posiciones de residuos por fuera de los extremos terminales N y C de la secuencia sujeto, tal como se presentan en el alineamiento CLUSTALW, que no coinciden/se alinean con la secuencia referida se corrigen manualmente. No se requieren otras correcciones manuales para propósitos de la presente invención.
- Las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, no codificadoras, o ambas. Especialmente se prefieren variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético son las preferidas. Adicionalmente, también se prefieren variantes en las cuales 5-10,1-5, o 1-2 aminoácidos se sustituyen, eliminan o adicionan en cualquier combinación.
- Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de un codón para un huésped en particular (cambios de codones en el ARNm con respecto a los preferidos por un huésped bacteriano tal como E.coli). Las variantes de origen natural se denominan "variantes alélicas" y se refieren a una a varias formas alternas de un gen que ocupa un locus dado sobre un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar bien a nivel de polinucleótidos/polipéptidos están incluidas en la presente invención.
- Alternativamente, puede producirse variantes de origen o natural por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.
- Utilizando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnologías de ADN recombinante, puede generarse variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser eliminados del término N o C la proteína sin pérdida sustancial de la función biológica. Los autores de Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), informaran acerca de proteínas KGF variantes que tenían actividad de enlazamiento de heparina aún después de eliminar los residuos de aminoácidos 3,8 o 27 amino terminales.
- De la misma forma el interferón gamma exhibió una actividad hasta 10 veces más alta después de eliminar los residuos de aminoácidos 8 -10 del término carboxi de esta proteína (Dobeli et al., J. Biotechnology 7: 199-216 (1988)).
- Adicionalmente, evidencias amplias demuestran que las variantes mantienen frecuentemente una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. P. Chem 268 : 22105-22111 (1993)) llevaron a cabo análisis mutacionales extensos de la citoquina IL-1a humana. Utilizaron mutagénesis para generar más de 3500 mutantes IL-1a individuales que tenían como promedio 2.5 cambios de aminoácidos por variante a lo largo de toda la longitud de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posible posición de aminoácidos. Los investigadores encontraron que " la mayor parte de la molécula podría ser alterada con poco efecto sobre [la actividad de enlazamiento biológica]". En efecto, solamente 23 unidades de aminoácidos únicas, de un total de más de 1300 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en actividad de la proteína tipo silvestre.
- Adicionalmente, si la eliminación de uno o más aminoácidos del término N o el término C de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más de las funciones biológicas, pueden aún retenerse otras actividades biológicas. Por ejemplo, la capacidad de una variante de eliminación para inducir y/o enlazar anticuerpos que reconocen la proteína probablemente se mantendrá cuando menos de la mayoría de los residuos de la proteína se eliminen del término N o del término C. Si un polipéptido en particular que carece de residuos N o C terminal de una proteína mantiene tales actividades inmunogénicas puede fácilmente determinarse por métodos de rutina descritos aquí y de alguna forma también conocidos en la técnica.

Así, la invención incluye adicionalmente variantes de polipéptidos que muestran actividad biológica sustancial. Tales variantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica de manera que tengan poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, la guía relativa a cómo hacer sustituciones de aminoácidos silenciosas fenotípicamente será en Bowie et al., Science 247: 1306-1310 (1990), donde los actores indican que hay dos principales estrategias para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia explota la tolerancia de las sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el proceso de la evolución. Comparando las secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. En contraste, las posiciones de aminoácidos donde las sustituciones han sido toleradas por la selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. Así, las posiciones que toleran la sustitución de los aminoácidos puede modificarse manteniendo aún la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia utiliza ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (introducción de mutaciones de alanina sencillas en cada residuo de la molécula) puede utilizarse para este caso (Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Las moléculas mutantes resultantes pueden ser probadas entonces en cuanto su actividad biológica.

Como establecen los autores, estas dos estrategias han mostrado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente cuáles cambios de aminoácidos son probablemente permisivos en ciertas posiciones de aminoácidos de la proteína. Por ejemplo, la mayor parte de los residuos de aminoácidos sepultados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que se conservan pocas características de las cadenas laterales superficiales. Adicionalmente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras toleradas involucran el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu y Ile; el reemplazo de los residuos hidroxilados Ser y Thr; reemplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; reemplazo de los residuos amida Asn y Gln, reemplazo de los residuos básicos Lys, Arg e His, reemplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp, y reemplazo los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met y Gly.

Adicionalmente a la sustitución de aminoácidos conservadores, los variantes incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: (i) sustituciones con uno o más de los residuos de aminoácidos no conservados, donde los residuos de aminoácidos sustituidos pueden o no ser codificados por el código genético, o (ii) sustitución con uno o más residuos de aminoácidos que tengan un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como compuesto para incrementar la estabilidad y/o solubilidad de polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como por ejemplo, un péptido de la región de fusión IgG Fc, o una secuencia guía o secretora, o una secuencia que facilita la purificación. Tales variantes de polipéptidos pueden estar dentro del alcance de aquellos experimentados en la técnica a partir de las enseñanzas presentes.

Por ejemplo, las variantes de polipéptidos que contienen sustituciones de aminoácidos cargados con otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas, con características mejoradas, tales como menos agregación. La agregación de las formulaciones farmacéuticas reduce tanto la actividad como incrementa la limpieza debido a la actividad inmunogenética del agregado.

(Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2: 331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987) ; Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377 (1993)). Además, la invención incluye adicionalmente variantes de polipéptidos creadas a través de la aplicación de metodología de evolución molecular ("barajado de ADN") al polinucleótido divulgado en SEQ ID NO: X y/o del ADNc que codifica el polipéptido divulgado como SEQ ID NO: Y. Tal tecnología de barajado de ADN es conocida en la técnica y más particularmente escrita aquí en algunos lugares (por ejemplo, WPC, Stemmer, PNAS, 91: 10747, (1994)), y ejemplo 20).

Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la presente invención puede tener una secuencia aminoácidos que contenga al menos una sustitución de aminoácido pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos, aún más preferiblemente, no más de 40 sustituciones de aminoácidos, aún más preferiblemente, no más de 30 sustituciones de aminoácidos, y aún más preferiblemente no más de 20 sustituciones de aminoácidos. Desde luego, con el fin de incrementar permanentemente la preferencia, es altamente preferible para un péptido o polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda la secuencia de aminoácidos de la presente invención, la cual contiene al menos uno pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución de aminoácidos. El número de adiciones, sustituciones y/o eliminaciones en la secuencia de aminoácidos de la presente invención o fragmentos de la misma (por ejemplo, la forma madura y/o otros fragmentos descritos aquí) puede ser 1-5,5-10,5-25,5-50,10-50,50-150, de sustituciones de aminoácidos conservadoras preferibles.

Fragmentos de Polinucleótidos y Polipéptidos.

La presente divulgación describe fragmentos de polinucleótidos de la invención, además de los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos y/o fragmentos.

5 La presente divulgación, un "fragmento de polinucleótido" se refiere a un polinucleótido corto que tiene secuencia de ácidos nucleicos la cual: es una porción de la mostrada en SEQ ID NO: X o la cadena complementaria de la misma, o es una porción de una secuencia de polinucleótidos que codifican el polipéptido de SEQ ID NO: Y. Los fragmentos de nucleótidos puede ser al menos 15nt aproximadamente, y más preferiblemente al menos de forma aproximada 20nt, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 30nt, y aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 40nt, al menos aproximadamente 50nt, al menos aproximadamente 75nt o al menos aproximadamente 50nt de longitud. Un fragmento "al menos 20nt de longitud", por ejemplo, se entiende que incluye 20 o más bases contiguas de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: X. En este contexto "aproximadamente" incluye el valor particularmente citado, un valor más grande o más pequeño por varios nucleótidos (5, 4, 3, 2, o 1) en el extremo terminal o en ambos terminales.

15 Estos fragmentos de nucleótidos tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sondas e iniciadores de diagnóstico tal como se discute aquí. Desde luego se prefieren fragmentos más grandes (por ejemplo, 50, 150, 500, 600, 2000 nucleótidos).

20 Adicionalmente ejemplos representativos de fragmentos de polinucleótidos de la divulgación incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden o alternativamente consisten de, una secuencia que va desde aproximadamente un número de nucleótidos 1-50,51-100,101-150,151-200,201-250,251-300,301-350,351-400,401-450,451-500,501-550,551-600,651-700,701-750,751-800,800-850,851-900,901-950,951-1000,1001-1050,1051-1100,1101-1150,1151-1200,1201-1250,1251-1300,1301-1350,1351-1400,1401-1450,1451-1500,1501-1550,1551-1600,1601-1650,1651-1700,1701-1750,1751-1800,1801-1850,1851-1900,1901-1950,1951-2000, o 2001 hasta el extremo de SEQ ID NO:X, o la cadena complementaria del mismo. En este contexto "aproximadamente" incluye los rangos particularmente citados, y los rangos mayores o más pequeños por varios nucleótidos (5, 4, 3, 2 o 1), en cualquier término o en ambos términos.

30 Preferiblemente, estos fragmentos codifican un polipéptido que tiene actividad biológica. Más preferiblemente, estos polinucleótidos pueden ser utilizados como sondas o cebadores tal como se discutió aquí. También se abarca por parte de la presente divulgación polinucleótidos que hibridizan a estas moléculas de ácido nucleico utilizando condiciones de hibridaciones restrictivas o condiciones de más baja restricción, tal como los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

35 En la presente divulgación, un "fragmento de polipéptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que es una porción de la contenida en SEQ ID NO: Y. Los fragmentos de proteína (polipéptidos) pueden ser "libres" o comprendidos dentro de un polipéptido más grande del cual el fragmento forma una parte o región, lo más preferiblemente como una región sencilla continua. Ejemplos representativos de fragmentos de polipéptidos de la divulgación incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o alternativamente consisten de número de aminoácidos aproximadamente 1-20,21-40,41-60,61-80,81-100,102-120,121-140,141-160, o 161 en el extremo de la región codificadora. Adicionalmente, los fragmentos de polipéptidos puede ser aproximadamente 20,30, 40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140, o 150 aminoácidos en longitud. En este contexto "aproximadamente" incluye los rangos o valores particularmente citados y rangos o valores más grandes o más pequeños por varios aminoácidos (5, 4, 3, 2 o 1), en cualquier extremo o en ambos extremos.

45 Los fragmentos de polipéptidos incluye la proteína de longitud completa. Fragmentos de polipéptidos influyen la proteína de longitud completa que tiene una serie continua de residuos eliminados del extremo amino o carboxi, o ambos. Por ejemplo, cualquier número de aminoácidos, que varía de 1 a 60, puede eliminarse del término amino del polipéptido de longitud completa. De la misma forma, cualquier número de aminoácidos, que varía de 1-30 puede eliminarse del término carboxi de la proteína de longitud completa. Adicionalmente, se escribe cualquier combinación de las anteriores eliminaciones términos amino y carboxi. De la misma forma, los polipéptidos que codifican estos fragmentos de polipéptidos también se escriben aquí.

50 También se describen fragmentos de polipéptidos y polinucleótidos caracterizados por dominios estructurales o funcionales, tales como fragmentos que comprenden regiones de hélice alfa y formadoras de hélice alfa, regiones de hoja beta y formadoras de hoja beta, regiones de giro y formadoras de giro, regiones de entorchamiento y formadoras de entorchamiento, regiones hidrofílicas, regiones hidrófobas, regiones  $\alpha$ -anfifáticas, regiones anfifáticas  $\beta$ , regiones flexibles, regiones formadoras de superficie, región de enlazamiento de sustratos, y regiones de alto índice antigénico. Los fragmentos de polipéptido de SEQ ID NO: Y que caen dentro de dominios conservados se contemplan específicamente en la presente divulgación.

Adicionalmente, también se contemplan los polinucleótidos que codifican estos dominios.

65 Otros fragmentos de polipéptidos preferidos son fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que exhiben una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del

polipéptido de la presente invención. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad deseada mejorada, o una actividad disminuida indeseable.

Los polinucleótidos que codifican estos fragmentos de polipéptidos también son abarcados por la divulgación.

En una realización preferida, la actividad funcional desplegada por un polipéptido codificado por un fragmento de polinucleótido puede ser una o más actividades biológicas típicamente asociadas con el polipéptido de longitud completa de la invención. Ilustrativos de estas actividades biológicas son la capacidad de los fragmentos para enlazarse a al menos uno de los mismos anticuerpos que se enlazan a la proteína de longitud completa, la capacidad de los fragmentos para interactuar con al menos una de las mismas proteínas que se enlazan a la longitud completa, la habilidad de los fragmentos para elicitar al menos una de las mismas respuestas inmunes que la proteína longitud completa (esto es, causa de que el sistema inmune cree anticuerpos específicos para el mismo epítipo, etc.), la capacidad los fragmentos para enlazarse al menos uno de los mismos polinucleótidos que la proteína de longitud completa, la habilidad de los fragmentos para enlazarse a un receptor de la proteína longitud completa, la habilidad de fragmentos para enlazarse a un ligando de la proteína de longitud completa, y la habilidad de los fragmentos para multimerizarse con la proteína longitud completa.

Sin embargo, el experto en la técnica se apreciará que algunos fragmentos pueden tener actividades biológicas que son deseables y directamente opuestas a la actividad biológica de la proteína de longitud completa. La actividad funcional de los polipéptidos, incluyendo fragmentos, variantes, derivadas y análogos de las mismas pueden determinarse por numerosos métodos disponibles para el técnico experimentado, algunos de los cuales se describen en algún lugar aquí.

#### Epítopos y Anticuerpos

La presente divulgación, "epítopos" se refiere a fragmentos de polipéptidos que tienen actividad antihigénica y/o inmunogénica en organismo, preferiblemente un animal o una planta. Una región de una molécula de proteína a la cual puede enlazarse un anticuerpo se define como un "epítipo antigénico". En contraste, un "epítipo inmunogénico" se define como una parte de la proteína que elicitaba una respuesta de un anticuerpo (esto es, en animales) o una respuesta defensiva (esto es, en plantas). (Véase, por ejemplo Geyson et al., Proc. Natl. Aced. Sci. USA 81: 3998-4002 (1983)).

Los fragmentos de epítopos pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica.

Los epítopos que son inmunogénicos pueden ser útiles para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Tales epítopos pueden presentarse juntos con una proteína portadora tal como una albúmina, o pueden presentarse sin vehículo si el epítipo es de suficiente longitud (mayor que o igual a 25 aminoácidos). No obstante, se ha encontrado que los epítopos elicitaban una respuesta inmune que comprende tan poco como 8 a 10 aminoácidos. Los epítopos pueden ser epítopos lineales derivados de un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, el que se encuentra en Western blots).

Los epítopos antigénicos pueden contener una secuencia al menos 7, más preferiblemente al menos 9, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Los epítopos antigénicos son útiles para elevar los anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se enlazan específicamente al epítipo.

(Véase, por ejemplo Wilson et al., Cell 37: 767-778 (1984); Sutcliffe, J. G., et al., Science 219: 660-666 (1983)).

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) pretende incluir moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>) que son capaces de enlazarse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se limpian más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menor enlazamiento no específico a un tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med 24: 316-325 (1983)). Así como estos fragmentos son preferidos, así como los productos de un FAB o de otra biblioteca de expresión de inmunoglobulina. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

La presente divulgación proporciona además anticuerpos específicos para polipéptidos, fragmentos de polipéptidos y variantes de polipéptidos de la presente divulgación. Los anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, humanizados, completamente humanos, mono-específicos, bio-específicos, tri-específicos, heteroconjugados, quiméricos de cadena sencilla, de cadena liviana variable, de cadena pesada variable, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), anticuerpos derivados de la aparición del fago (aquellos derivados de una biblioteca expresión FABs, etc.), anticuerpos anti-idiotipo, y aquellos anticuerpos que tienen actividad enzimática (esto es, anticuerpos catalíticos). Los anticuerpos pueden estar comprendidos de cualquiera de los isotipos de anticuerpos corrientemente conocidos (por ejemplo, IgD, IgM, IgE, IgG, IgY, e IgA, etc.), las subclases IgA y IgG humanas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, o IgA2) o las subclases IgA e IgG de ratón (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA1, o IgA2).

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos monoclonales. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales son conocidos para los expertos en la técnica (Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed. (1988)). Los anticuerpos policlonales pueden elevarse en un mamífero o ave, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante, si se desea, un adyuvante. "Agente inmunizante" puede definirse como un polipéptido de la invención, que incluye fragmentos, variantes, y/o derivados de los mismos, además de fusiones con polipéptidos heterólogos y otras formas de los polipéptidos descritas aquí.

Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectara en el mamífero por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples, aunque también pueden ser dados de forma intramuscular, y/o a través de IV. El agente inmunizante fue incluir polipéptidos de la presente invención o una proteína de fusión o variantes de las mismas. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (esto es, porcentaje de hidrofobicidad, hidrofiliidad, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína de la que se sepa que es inmunogénica en el mamífero que está siendo inmunizado. Tal conjugación incluye bien sea conjugación química derivando los grupos funcionales químicos activos a tanto el polipéptido de la presente invención como la proteína inmunogénica de tal forma que se forman enlace covalente, o a través de metodología basada proteína fusión, u otros métodos conocidos para el técnico experimentado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa de cerradura, albumina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de la soja. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo pero no limitándose a la de Freund (completa e incompleta), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficialmente tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de cerradura, dinitrofenol, y potencialmente adyuvantes humanos útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluye el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trealosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por la persona experimentada en la técnica sin ninguna experimentación innecesaria.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975) y la patente de los Estados Unidos No. 4,376,110, de Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Coldspring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)), by Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N. Y., (1981)), u otros métodos conocidos para el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma de células B humana (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase las mismas. El hibridoma que produce el mAb puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de altos títulos de mAbs in vivo hace que éste sea el método actualmente preferido de producción.

En un método de hibridoma, un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmune humana, hámster u otro animal huésped aplicable, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para elicitar los linfocitos que producen no son capaces de producir anticuerpos que se enlazarán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro.

El agente inmunizante típicamente incluirá polipéptidos de la presente invención o una proteína de fusión de los mismos. En general, se utilizan bien sea linfocitos sanguíneos periféricos ("PBLs") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nodo de linfa si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp. 59- 103). Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origen en roedores, bovinos y humanos. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo apropiado que preferiblemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si la célula original carece de la enzima hiruelaantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT O HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hiruelaantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan deficientemente, soportan una expresión a alto nivel estable y anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murina, que pueden ser obtenidas, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y el American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Tal como se infiere a lo largo de la especificación, las líneas celulares de heteromiéloma humano y ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

5 El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se cultivan puede ser probado en cuanto a la presencia anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención. Preferiblemente, la especificidad de enlazamiento de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridomas se determina por inmunoprecipitación o por una prueba de enlazamiento in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado enzima (ELISA). Tales técnicas son conocidas en el arte y están al alcance del experto. La afinidad de enlazamiento del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson and Pollart, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

10 Después de que las células deseadas del hibridoma son identificadas, los clones pueden ser subclonados limitando procedimientos de dilución y crecimiento por métodos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo para este propósito incluyen, por ejemplo, medio Dulbecco Modified Eagle's y RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como ascitas en un mamífero.

15 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a través del medio de cultivo o del fluido de las ascitas por procedimientos de purificación con inmunoglobulina convencional tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxapatita, cromatografía de exclusión por gel, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El experto en la técnica reconocerá que existe una gran variedad de métodos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales y así, la divulgación no se limita a su sola producción en hibridomas. Por ejemplo, en los anticuerpos monoclonales pueden hacerse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 4,816,567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un eucariote individual, fago o clon procariontico. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la divulgación puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican que las cadenas pesadas livianas de los anticuerpos murinicos, o las mismas cadenas de fuentes humanas, u anizadas u otras). Las células de hibridoma de la divulgación sirven como una fuente preferida de tal ADN.

20 Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que luego son transformados en células huésped tales como células de simio COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen la proteína inmunoglobulina de ninguna otra manera, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes de cadena pesada y liviana humanos en lugar de secuencias homólogas murinicas (patente de los Estados Unidos No. 4, 81 6.567; Morrison et al, *supra*) o enlazando de forma covalente en la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la divulgación, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno del anticuerpo de la divulgación para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

30 Los anticuerpos pueden anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método que involucra expresión recombinante de la cadena ligera de la inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada es truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se prevenga el entrecruzamiento de cadenas pesadas.

35 Alternativamente, los residuos relevantes de cistina se sustituyen con otros residuos de aminoácidos o son eliminados de manera que se prevenga el entrecruzamiento.

40 Los métodos in vitro también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab puede lograrse utilizando técnicas de rutina conocidas de la técnica.

45 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados anticuerpos completamente humanos (humanos). Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murina) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas frecuentes de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras secuencias de anticuerpos enlazantes con antígenos) que contiene mínimas secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpos del receptor) en los cuales los residuos de una región complementaria determinante (CDR) del receptor son reemplazados con residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos los residuos del marco Fb de la inmunoglobulina humana son reemplazados con residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que se encuentran bien sea en el anticuerpo receptor ni el CDR importado o las secuencias de marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones Fr son las de secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá al menos una porción de un región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una

50

55

60

65

inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) 1 and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

5 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanizados son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son denominados frecuentemente como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988) ; Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988), sustituyendo los CDR de los roedores o las secuencias CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los Estados Unidos No. 4,816,567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de Fr son sustituidos de los sitios análogos en anticuerpos de roedores.

20 Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en el arte, incluyendo las bibliotecas de despliegue de fagos (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al., y Boerder et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss, (1985) ; and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1) : 86-95, (1991)). De la misma forma, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Al hacer el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, lo cual recuerda cercanamente lo visto en humano en todos los aspectos incluyendo la reordenación genética, ensamblaje y creación de un repertorio de anticuerpos.

25 Esta metodología es descrita, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,106, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszer, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

30 Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855 ; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, *Nature*, 314: 452-454) por seccionamiento de los genes a partir de una molécula de anticuerpo de raton de una especificidad apropiada a los antígenos junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada pueden utilizarse en este caso. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual se derivan diferentes porciones de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de una murina mAb y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., U. S. Pat. No. 4,816,567; and Boss et al., U. S. Pat. No. 4,816,397,.)

35 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos específicos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de enlazamiento para al menos dos antígenos diferentes. Una de las especificidades de enlazamiento puede dirigirse hacia un polipéptido de la presente invención, la otra puede ser para cualquier antígeno, y preferiblemente para una proteína de superficie celular, receptor, unidad subreceptora, antígeno específico para un tejido, proteína derivada viralmente, envoltura de proteína codificada viralmente, proteína derivada bacterianamente, o proteína de superficie bacteriana, etc.

40 Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en al coexpresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada/ligera, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo usualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimiento similares se describen en WO 93/08829, publicada el 13 de Mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

45 Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de enlazamiento deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse en secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos en parte de al bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) con contenido del sitio necesario para el enlazamiento de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina, y si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son cotransformados en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales sobre la generación de anticuerpo biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Meth. In Enzym.*, 121: 210 (1986).

También se conocen anticuerpos heteroconjugados .

5 Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Se ha propuesto que tales anticuerpos por ejemplo apunten células del sistema inmune hacia células no deseadas (patente de los Estados Unidos No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360 ; WO 92/20373; y EP03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que involucran agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los divulgados, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4,676,980.

Uso de Anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de la invención.

15 Tales anticuerpos tienen diversas utilidades. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden utilizarse en pruebas de diagnóstico para detectar la presencia o cuantificación de los polipéptidos de la invención en una muestra. Tal prueba de diagnóstico puede comprender al menos dos etapas. La primera, someter una muestra con el anticuerpo, donde la muestra es un tejido (por ejemplo, animal, planta, etc.), fluido biológico (por ejemplo, sangre, orina, fluido del floema, fluido del xilema, secreción vegetal, etc.) extracto biológico (por ejemplo, homogenizado de tejido o celular, etc.), un microchip de proteína (por ejemplo, véase Arenkov P, et al., *Anal Biochem.*, 278 (2): 123-131 (2000)), o una columna de cromatografía, etc. Y una segunda etapa involucra la cuantificación del anticuerpo enlazado al sustrato. Alternativamente, el método puede involucrar adicionalmente una primera etapa de unir el anticuerpo, bien sea de forma covalente, electrostática o reversible, a un soporte sólido, y una segunda etapa de someter el anticuerpo enlazado a la muestra, tal como se definió más arriba y aquí más adelante.

25 Se conocen diversas técnicas de pruebas de diagnóstico en el arte, tales como ensayos de enlazamiento competitivo, ensayos de sandwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación conducidos tanto en fases heterogéneas como homogéneas (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., (1987), pp147-158). Los anticuerpos usados en las pruebas de diagnóstico pueden etiquetarse con una unidad estructural detectable. La unidad estructural detectable debe ser capaz de producir, bien sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la unidad estructural detectable puede ser un radioisótopo tal como <sup>2</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P y <sup>125</sup>I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, o una enzima tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, proteína verde fluorescente o peroxidasa de rábano. Cualquier método en la técnica para conjugar el anticuerpo a la unidad estructural detectable puede emplearse utilizando los métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); Dafvid et al., *Biochem.*, 13: 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Metho.*, 40: 219 (1981) ; and Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.*, 30 : 407 (1982).

40 Los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención son útiles para la purificación por afinidad de tales polipéptidos a partir de cultivos celulares recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra un polipéptido particular se inmovilizan sobre un soporte adecuado tal como resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto entonces con una muestra que contiene los polipéptidos que van a ser purificados, y después de ello el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminara sustancialmente todo el material en la muestra excepto los polipéptidos deseados, los cuales se enlazan al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado que libera el polipéptido deseado del anticuerpo. Los anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de la presente invención son útiles para inhibir reacciones alérgicas en animales. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, de la presente divulgación, o un coctel de los anticuerpos presentes, o en combinación con otros anticuerpos de fuentes diversas, el animal puede no elicitar una respuesta alérgica por ingestión de ciertos antígenos, particularmente antígenos de plantas. En un ejemplo notable, la lectina LEA de tomate, de *Lycopersicon esculentum* ha demostrado poder elicitar una fuerte respuesta inmune cuando se administra tanto oralmente, como i.n. en ratones. Así, la administración al ratón de los anticuerpos dirigidos contra la lectina LEA puede disminuir o incluso eliminar una respuesta inmune a la lectina LEA en tanto que la lectina LEA podría efectivamente ser eliminada de la circulación antes de elicitar una respuesta inmune (por ejemplo, véase Lavelle EC, et al., *Immunology*. 99 (1) : 30-7, (2000)). De la misma forma, se podría predecir la clonación del gen que codifica un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la presente invención, teniendo dicho polipéptido el potencial de elicitar una respuesta alérgica y/o inmune en un organismo, y transformar el organismo con dicho gen de anticuerpo de tal forma que se exprese (por ejemplo, constitutivamente, de forma inducible, etc.) en el organismo. Así, el organismo se haría efectivamente resistente a una respuesta alérgica resultante de la ingestión o presencia de tal polipéptido inmune/reactivo alérgico. Descripciones detalladas de aplicaciones terapéuticas y/o terapia de genes de la presente divulgación se proporcionan aquí más adelante.

60 Alternativamente, los anticuerpos de la presente divulgación podrían producirse en una planta (por ejemplo, clonando el gen del anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la presente invención, y transformando una planta con un vector adecuado que comprende dicho gen para expresión constitutiva del anticuerpo dentro de la planta), y la planta ser ingerida subsecuentemente por un animal, confiriendo por lo tanto inmunidad temporal al animal para el antígeno específico hacia el cual esta dirigido el anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,914,123 y 6,034,298).

65

Los anticuerpos de la presente divulgación, preferiblemente los anticuerpos policlonales, más preferiblemente los anticuerpos monoclonales, y los más preferiblemente los anticuerpos de cadena sencilla, pueden utilizarse como medios para inhibir la expresión genética de un gen o genes en particular, en una planta u organismo. Véase por ejemplo, la publicación internación No. WO 00/05391, publicada el 2/3/00 de Dow Agrosiences LLC. La aplicación de tales métodos para los anticuerpos de la presente divulgación es conocida en la técnica, y son particularmente descritos aquí (véase, Ejemplos 14 y 15).

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser útiles para multimerizar los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, ciertas proteínas pueden conferir actividad biológica potenciada cuando están presentes en un estado multimérico (esto es, tal actividad potenciada puede deberse a una concentración efectiva incrementada de tales proteínas con lo cual hay más proteína disponible en una localización definida).

Proteínas de Fusión.

Cualquier polipéptido de la presente invención puede utilizarse para generar proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención, cuando se fusiona con una segunda proteína, puede utilizarse como marcador antigénico. Los anticuerpos que surgen contra el polipéptido de la presente invención pueden ser utilizados para detectar indirectamente la segunda proteína enlazando C con el polipéptido. Además, puesto que ciertas localizaciones objetivo de proteínas basadas en señales de tráfico, los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse como moléculas objetivo una vez fusionadas con otras proteínas.

Ejemplos de dominios que pueden ser fusionados con polipéptidos de la presente invención incluyen no solamente secuencias de señal heteróloga, sino también otras regiones funcionales heterólogas. La fusión no necesariamente necesita ser directa, sino que puede ocurrir a través de secuencias enlazantes.

Adicionalmente, las proteínas de fusión también pueden ser diseñadas para mejorar características del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, puede adicionarse al término N del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación de la célula huésped o de la manipulación y almacenamiento subsecuente. Pueden adicionarse unidades estructurales peptídicas al polipéptido para facilitar la purificación. Tales regiones pueden ser eliminadas antes de la preparación final del polipéptido.

De la misma forma, los sitio de escisión de péptidos pueden introducirse en medio de tales unidades estructurales peptídicas, las cuales adicionalmente serian sometidas a la actividad de la proteasa para eliminar dicho péptido (s de la proteína de la presente invención). La adición de unidades estructurales peptídicas, incluyendo sitios de escisión de péptidos, para facilitar la manipulación de los polipéptidos son técnicas familiares y de rutina en el arte.

Además, los polipéptidos de la presente divulgación, incluyendo fragmentos, y especialmente epítopos pueden ser combinados con partes del dominio constante de las inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o porciones de las mismas (CH1, CH2, CH3 y cualquier combinación de las mismas, incluyendo dominios completos y porciones de las mismas), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una vida media incrementada in vivo. Un ejemplo informado describe de proteínas quiméricas que consisten de los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesadas o livianas de inmunoglobulina de mamíferos. (EP A 394,827; Trauneker et al., Nature 331: 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas enlazadas por disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficientes en el enlazamiento y neutralización de otras moléculas, que la proteína monomérica secretada o el fragmento de proteína solo. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)). De la misma forma, la EP-A-O 464 533 (contraparte canadiense 2045869) divulga proteínas de fusión que comprenden diversas porciones de la región constante de las moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es benéfica en terapia y diagnóstico, y así puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas. (EP-A 0232 262). Alternativamente, puede ser deseable eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión ha sido expresada, detectada y purificada. Por ejemplo, la porción Fc puede obstaculizar la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se utiliza como un antígeno para inmunizaciones. En descubrimiento de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas, tales como hIL-5 han sido fusionadas con porciones Fc para propósito de realizar pruebas de selección de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5 (véase, (Véase, D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8: 52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995)). Además, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias marcadoras (también denominadas "etiquetas"). Debido a la disponibilidad de anticuerpos específicos para tales "etiquetas", la purificación del polipéptido fusionado de la invención y/o su identificación se facilita significativamente puesto que no se requieren los anticuerpos específicos para los polipéptidos de la invención.

Tal purificación puede ser en la forma de una purificación por afinidad mediante la cual un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz definida (por ejemplo, anticuerpo de anti-etiqueta conectado a la matriz de una columna de flujo) que se enlaza la etiqueta del epítipo presente. La secuencia de aminoácido marcadora puede ser un péptido exahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth,

CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821- 824 (1989), por ejemplo, exahistidina proporciona la purificación conveniente para la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica utilizada para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la influenza. (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)).

5 El experto en la técnica reconocerá la existencia de otras "etiquetas" que podrían ser utilizadas fácilmente en vez de las etiquetas citadas más arriba para purificación y/o identificación de polipéptidos de la presente invención (Jones C., et al., J Chromatogr A. 707 (1): 3-22 (1995)).

10 Por ejemplo, la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9,3C7,6E10, G4m B7 y 9E10 de las mismas (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5: 3610-3616 (1985)); la glicoproteína D del virus Herpes simplex etiqueta (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990), el péptido bandera, esto es, la secuencia optapeptídica DYKDDDDK (SEQID NO : 17), (Hopp et al., Biotech. 6: 1204-1210 (1988); el péptido del epítipo KT3(Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)); un péptido del epítipo es la tubulina (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15136- 15166, (1991)); la etiqueta peptídica de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Sci. USA, 87: 6363-6397 (1990)), el epítipo FITC (Zymed, Inc.), el epítipo GFP (Zymed, Inc.), y el epítipo Rodamina (Zymed, Inc.).

20 La presente divulgación también abarca la unión de la región codificadora de una serie repetitiva de hasta nueve aminoácidos de arginina a un polinucleótido de la presente invención. La divulgación también abarca la derivación química de un polipéptido de la presente invención con una serie repetitiva de hasta 9 aminoácidos de arginina. Tal etiqueta, cuando se une a un polipéptido ha demostrado hace poco servir como paso universal, permitiendo que los compuestos tengan acceso al interior de la célula sin derivación manipulación adicional (Wender, P., et al., datos no publicados).

25 Las funciones proteínicas que involucran polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para los siguientes ejemplos no limitantes, localización subcelular de proteínas, determinación de interacciones proteína -proteína a través de inmunoprecipitación, purificación de proteínas a través de cromatografía de afinidad, caracterización funcional y/o estructural de proteínas. La presente divulgación también abarca la aplicación de anticuerpos hapten específicos para cualquiera de los usos citados más arriba para proteínas de fusión de epítipos.

30 Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención podrían derivarse químicamente para conectar moléculas hapten (por ejemplo, DNP, (Zymed, Inc.)). Debido a la disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para tales haptens, las proteínas podrían ser purificadas fácilmente utilizando inmunoprecipitación, por ejemplo.

35 Los polipéptidos de la presente invención además de, anticuerpos dirigidos contra tales polipéptidos pueden ser fusionados en cualquier número de toxinas conocidas, y aún por ser determinadas, tales como recina, saporina (Mashiba H, et al., Ann N Y Acad Sci. 1999; 886: 233-5), toxina HC (Tonukari NJ, et al., Plant Cell. 2000 Feb; 12 (2): 237-248), endotoxina BT o endotoxina de pseudomonias. Tales fusiones pueden ser utilizadas para liberar las toxinas a los tejidos deseados por los cuales existe obligando o una proteína capaz de enlazar los polipéptidos de la invención.

45 La divulgación abarca la fusión de anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención, incluyendo variantes y fragmentos de los mismos, a dichas toxinas para administrar la toxina en localizaciones específicas en una célula, en tejidos vegetales específicos, y/o en especies vegetales específicas. Tales anticuerpos bifuncionales son conocidos en la técnica, aunque puede encontrarse una revisión que describe las fusiones ventajosas adicionales, incluyendo citas de los métodos de producción, en P. J. Hudson, Curr. Opp. In Imm. 11: 548-557, (1999). En este contexto, el término "toxinas" puede expandirse para incluir cualquier proteína heteróloga, una molécula pequeña, radionucleótidos, grupos citotóxicos, liposomas, moléculas de adhesión, glicoproteínas, ligandos, ligandos específicos para células o tejidos, enzimas, agentes bioactivos, modificadores de la respuesta biológica, agentes antifúngicos, hormonas, esteroides, vitaminas, péptidos, análogos de péptidos, agentes antialérgicos, agentes antituberculosos, agentes antivirales, antibióticos, agentes antiprotozoarios, quelatos, partículas radiactivas, iones radioactivos, agentes de contraste para rayos X, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y material genético. A la vista la presente divulgación, una persona experimenta en la técnica podría determinar si cualquier "toxina" en particular podría utilizarse en los compuestos. Ejemplos de "toxinas" adecuadas listadas más arriba son solamente a título ilustrativo y no pretende limitar "toxinas" que pueden ser utilizadas en la presente invención.

60 Así, cualquiera de estas funciones puede ser manipulada utilizando los polinucleótidos o los polipéptidos de la presente invención.

Vectores, Células Huésped y Producción de Proteínas.

65 Un aspecto de la presente invención también se relaciona con vectores que contienen el polinucleótido de la presente invención y las células vegetales que contienen dicho vector.

El rector puede ser, por ejemplo, un fago, un plásmido, un vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso la propagación viral generalmente se presenta solamente en células huésped complementarias.

5 Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para propagación en un huésped. En general, se introduce un vector plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lipido cargado. Si el vector es un virus, puede empacarse in vitro usando una línea celular de empaque apropiada y luego ser transducido a las células huésped.

10 El inserto de polinucleótido la presente invención podría ser enlazado operativamente a un promotor apropiado, tal como un promotor 35S, el promotor 34S, promotor CMV, el promotor fago lambda PL, los promotores de *E. coli* lac, trp, phoA y tac, los promotores temprano y tardios SV40 y los promotores de los LTRs retrovirales, para nombrar unos pocos. Además, puede ser deseable, o requerido, en algunos casos tener promotores específicos para un tejido o específicos para tipo celular enlazados operativamente a un polinucleótido de la presente invención.  
 15 Ejemplos de tales promotores expresables en plantas adecuados expresados particularmente en tejidos particulares o tipos de células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan, a promotores específicos para semillas (por ejemplo WO 89/03887), promotores específicos para órganos primordiales (An et al., *Plant Cell*, 8: 15-30, (1996)), promotores específicos para tallos (Keller et al., *EMBO J.*, 7: 3625-3633, (1988)), promotores específicos para hojas (Hudspeth et al., *Plant. Mol. Biol.*, 12: 579-589, (1989)), promotores específicos del mesofilo (tales como los promotores Rubisco inducibles por la luz), promotores específicos para la raíces (Keller et al., *Genes Devel.*, 3: 1639-1646, (1989)), promotores específicos de los tubérculos (Keil et al., *EMBO J.*, 8 : 1323-1330, (1989)), promotores específicos de los tejidos vasculares (Peleman et al., *Gene*, 84: 359-369, (1989)), promotores específicos del meristema (tales como el promotor del gen SHOOTMERISTEMLESS (STM) , Long, et al., *Nature*, 379: 66-69, (1996)), promotores específicos de primordia (tales como el promotor del gen Antirrino CycD3a, Doonan et al., in "*Plant Cell Division*" (Francis, Duditz, and Inze, Eds), Portland Press, London, (1998)), otros promotores específicos (WO 89/10396, WO 92/13956, y WO 92/13957), promotores específicos del estigma (WO 91/02068), promotores específicos de la zona de degiscencia (WO 97/13865), promotores específicos de la semilla (WO89/03887), etc.

20 Promotores adicionales que pueden ser enlazados de forma operativa a un polinucleótido de la presente invención pueden encontrarse en McElroy and Brettel, *Tibtech*, Vol. 12, Febrero, 1994. Adicionalmente, se está usando actualmente un cierto número promotores para la transformación de las plantas dicotiledonias.

30 Esos promotores vienen de una variedad de diferentes fuentes. Un grupo de promotores usados comúnmente fueron aislados del *Agrobacterium tumefaciens*, donde funcionaba conduciendo la expresión de los genes de opina sintasa portados sobre el segmento T- ADN que está integrado en el genoma la planta durante la infección. Estos promotores incluyen el promotor de octopina sintasa (ocs) (L. Comai et al., 1985; C. Waldron et al., 1985), el promotor de manopina sintasa (L. Comai et al., 1985; K. E. McBride and K. R. Summerfelt, 1990), y el promotor de nopalina sintasa (M.W. Bevan et al., 1983; L. Herrera-Estrella et al., 1983, R. T. Fraley et al., 1983, M. De Block et al., 1984; R. Hain et al., 1985). Estos promotores son activos en una amplia variedad de tejidos vegetales.

35 Además, los promotores divulgados en las presentes publicaciones también puede estar enlazados operativamente a un polinucleótido de la presente invención. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,623,067; 5,712,112; 5,723,751; 5,723,754; 5,723,757; 5,744,334; 5,750,385; 5,750,399; 5,767,363; 5,783,393; 5,789,214; 5,792,922; 5,792,933; 5,801,027; 5,804,694; 5,814,618; 5,824,857; 5,824,863; 5,824,865; 5,824,866; 5,824,872; y 5,929,302; y las publicaciones internacionales Nos. WO 97/49727, WO98/00533, WO 98/03655, WO 98/07846, WO 98/08961, WO 98/08962, WO 98/10734, WO 98/16634, WO 98/22593, WO 98/38295, y WO 98/44097; y la solicitud de patente europea No. EP 0 846 770.

40 Se usan varios promotores virales para conducir la expresión genética heteróloga en dicotiledóneas (J. C. Kridl and R. M. Goodman, 1986) y pueden enlazarse de forma operativa a un polinucleótido de la presente invención. El promotor 35S del virus mosaico de la coliflor es uno de los promotores que se usan más frecuentemente en la transformación de dicotiledóneas puesto que confiere altos niveles de expresión genética en casi todos los tejidos (J. Odell et al., 1985; D. W. Ow et al., 1986; D. M. Shah et al., 1986). También se utilizan modificaciones desde  
 45 promotor, incluyendo una configuración con dos promotores 35S en tándem (R. Kay et al., 1987) y el promotor más 35S (L. Comai et al., 1990) el cual consiste el promotor de manopina sintasa en tándem con el promotor 35S. Ambos promotores conducen a niveles más altos de la expresión genética que una copia sencilla el promotor 35S. Otros promotores que han sido utilizados incluyen el promotor 19S del virus mosaico de la coliflor (J. Paszkowski et al., 1984; E. Balazs et al.) y el promotor 34S del virus mosaico del higo (M. Sanger et al., 1990).

50 Alternativamente, el inserto de polinucleótido de la presente invención podría enlazarse operativamente a cualquiera de un cierto número de promotores inducibles conocidos de la técnica, los cuales incluyen, pero no se limitan a: promotores inducibles por tetraciclina, promotores inducibles por moléculas pequeñas, promotores inducibles por la luz, compuestos químicos (por ejemplo, aseguradores, herbicidas, glucocorticoides, etc.), promotores inducibles por tensión abiótica (por ejemplo, heridas, metales pesados, promotores sensibles al frío, promotores sensibles al calor, promotores sensibles a la sal, promotores sensibles a la sequedad, inducibles por hivruelaia (tales como los  
 55 60 65

divulgados en EP1012317), etc.), promotores de tensión biótica (por ejemplo, infección por patógenos o por plagas incluyendo infección por hongos, virus, bacterias, insectos, nematodos, micoplasmas, y organismos similares a micoplasmas, etc.). Ejemplos de promotores inducibles expresables en plantas adecuados para la invención son: promotores inducibles por dematodos (tales como los divulgados WO 92/21757 y/o EP1007709), promotores inducibles por hongos (WO 93/19188, WO 96/28561), promotores de Arabidopsis PR-1 (WO 98/03536), los promotores inducibles divulgados en WO 98/45445, los promotores inducibles divulgados en la patente de los Estados Unidos No. 5.804.693, el promotor inducible de frutos blandos de tomates divulgado en la patente de Estados Unidos No. 5.821.398, lo promotores inducibles después de la aplicación de glucocorticoides tales como dexametazona o promotores reprimidos o activados después de la aplicación de tetraciclina (Gatz et al., PNAS USA, 85: 1394-1397, (1988)). Otros promotores inducibles adecuados serán conocidos para el experto la técnica.

Además el inserto de polinucleótido de la presente invención podría enlazarse operativamente a promotores "artificiales" o quiméricos y factores de transcripción. Específicamente, el promotor artificial podría comprender, o consistir alternativamente, cualquier combinación de elementos de ADN actuante en *sis* que se reconocen por los factores de transcripción que actúan en *trans*. De forma preferible, estos elementos de secuencia de ADN actuantes en *sis* y los factores de transcripción actuantes en *trans* son operables en plantas. Adicionalmente, los factores de transcripción de transacción de tales promotores "artificiales" o químicos en diseño por sí mismos y podrían actuar como activadores o represores de dicho promotor "artificiales". Por ejemplo, un promotor quimérico podría comprender una o más secuencias activadores corriente arriba del gen octopina sintasa (OCS), regiones de enlazamiento de matriz (MAR), etcétera.

Los constructos de expresión contendrán adicionalmente sitios para la iniciación, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio enlazamiento del ribosoma para traducción. La porción del código de los transcritos expresados por los constructos pueden incluir un codón de iniciación de la traducción en el inicio o un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) posesionados apropiadamente al final del polipéptido que va ser traducido.

Los constructos de expresión pueden comprender adicionalmente secuencias guía 5' de los constructos de expresión. Tales secuencias guía pueden actuar para potenciar la traducción. Las guías de producción son conocidas en la técnica e incluyen: guías de picornavirus, por ejemplo, guía EMCV (región 5' no codificante encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R., and Musgo, B. (1989) PNAS USA, 86: 6126-6130); guías de potivirus por ejemplo, guía TEV (virus del borde del tabaco) (Allison et al.(1986)) ; guía MDMV (virus mosaico del maíz enano) Virology, 154: 9-20); proteína enlazamiento de cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak, D. G., and Samow, P. (1991) Nature, 353: 90-94; ya no traducida del ARNm de la proteína de recubrimiento del virus mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), (Jobling, S. A., and Gehrke, L., (1987) Nature, 325: 622-625); guía del virus mosaico del tabaco (TW), (Vesiculaie, D. R. et al. (1989) Molecular Biology of RNA, pages 237-256); y guía del virus moteado colorotico del maíz (MCNW) (Lommel, S. A. et al. (1991) Virology, 81: 382-385). Véase también, Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiology, 8196506&. También pueden utilizarse otros métodos conocidos para potenciar la traducción, por ejemplo, intrones y similares.

Como se indicó, los vectores de expresión pueden incluir al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, hidrofolato reductasa G418 con resistencia a la neomicina, resistencia a la kanomicina, resistencia a la hidromicina, resistencia a bialafos, resistencia a la sulfonamida, resistencia a la estreptomycin, resistencia a la espectinomycin, resistencia al clorosulfuron, resistencia al glifosfato y resistencia al metotrexato, para cultivos de células eucarióticas y tetraciclina, canamicina o genes de resistencia a la canamicina o ampicilina, para cultivo de *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a células bacterianas tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como células de levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (acceso ATCC No.201178)); células de insectos tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células de CHO, COS, 293, y melanoma de Bowes; células vegetales, células de plantas y/o tejidos derivados de una de las plantas que aparecen en la Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones apropiadas para las células huésped antes descritas son conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden ser apuntados al cloroplasto o aminoplasto. De esta forma, el constructor expresión contendrá adicionalmente una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de tránsito enlazado operativamente al polinucleótido de la presente invención para dirigir al polinucleótido de la presente invención hacia los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clark et al. (1989) J Biol. Chem. 264: 17544-17550; della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84065060 R. omer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res Commun. 196: 1414-1421; and Shah et al. (1986) Science 233: 478-481.

El constructor expresión también puede comprender cualquier otro regulador necesario tales como señales de localización nuclear (Kalderon et al. (1984) Cell 39: 499-509; and Lassner et al. (1991) Plant Molecular Biology 17: 229-234); plant translational consensus sequences (Joshi, C. P. (1987) Nucleic Acids Research 15: 6643 6653), introns (Luehrsen and Walbot (1991) Mol. Gen. Genet. 225: 81-93) y similares, enlazados operativamente a un polinucleótido de la presente invención.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas o polipéptidos de la presente invención pueden ser particularmente útiles en la manipulación genética de plantas. De esta forma, los polinucleótidos de la invención se proporcionan en cassettes de expresión para la expresión en la planta interés. Cuando esa propiedad o, recién con los genes pueden ser optimizados para una expresión incrementada en la planta transformada. Esto es, los polinucleótidos pueden ser sintetizados utilizando codones preferidos de plantas para una expresión mejorada específica para una especie en particular. Hay métodos disponibles en la técnica para sintetizar genes preferidos de plantas. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,380,831, 5,436,391 y Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. B7: 477-49 8.

Dependiendo de la especie en la cual se expresar la secuencia de ADN de interés, puede ser deseable sintetizar la secuencia con codones preferidos de plantas o alternativamente con codones preferidos de cloroplastos. Los codones preferidos de plantas pueden determinarse a partir de los codones de más alta frecuencia en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en la especie de planta particular de interés. Véase, EPA 0359472; EPA 0385962 ; WO 91/16432; Perlak et al. (1991)Proc. Natl. Acad Sci. USA 88: 3324-3328 ; and Murray et al. (1989) Nucleic Acids Research. De esta forma, las secuencias de polinucleótidos pueden optimizarse para expresión en cualquier planta. Se reconoce que toda o cualquier parte de la secuencia puede ser optimizada o sintética. Esto es, también pueden utilizarse secuencias sintéticas o parcialmente optimizadas.

Adicionalmente, puede ser deseable expresar selectivamente un polipéptido de la presente invención en una célula o tejido objetivo específica de una planta sintetizando la secuencia de polinucleótidos codificante para que contenga codones optimizados para una eficiencia translacional alta dentro de la célula o tejido particular. Tales métodos son reconocidos en la técnica y se proporcionan específicamente en la publicación internacional PCT No. WO 00/42190.

Se conocen modificaciones de secuencias adicionales para potenciar la expresión de los genes en una célula huésped. Incluye la eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación espúreas, señales de sitio de división exón-intron, repeticiones similares a transposones, y otras tales secuencias bien caracterizadas que pueden ser deletéreas para la expresión genética. El contenido G-C la secuencia por ajustarse niveles promedio para huésped celular dado, tal como se calculó por referencia con genes conocidos expresados en la célula huésped. Cuando es posible, la secuencia que modificarse para evitar estructuras de ARN secundarias capilares predichas.

Entre los vectores preferidos para el uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc. ; vectores pBluescript, vectores fagocript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponible en Stratagene Cloning Systems, Inc. ; y ptrc99a, pKK223- 3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponible en Pharmacia Biotech, Inc. vectores de expresión preferidos para uso en sistemas de levaduras incluyen, pero no se limitan a pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponible en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL disponible en Pharmacia. Vectores de expression preferidos para uso en sistemas de levaduras incluye, pero no se limitan a pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-Si, pPIC3.5K, pPIC9K, y PA0815 (todas disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA).

Vectores de expresión preferidos en sistemas de plantas incluyen, pero no se limitan a Bin 19 (ATCC Deposito No: 37327), GA437 (ATCC Deposito No: 37350), pAK1003 (ATCC Deposito No: 37425), pAS2022 (ATCC Deposito No: 37426), pAS2023 (ATCC Deposito No: 37427), pAP2034 (ATCC Deposito No: 37428), pC22 (ATCC Deposito No: 37493), pHS24 (ATCC Deposito No: 37841), pHS85 (ATCC Deposito No: 37842), pPMI (ATCC Deposito No: 40172), pGV3111SE (ATCC Deposito No: 53213), pCGN978 (ATCC Deposito No: 67064), pFL61 (ATCC Deposito No: 77215), pGPTV-KAN (ATCC Deposito No: 77388), pGPTV-HPT (ATCC Deposito No: 77389), pGPTV-DHFR (ATCC Deposito No: 77390), pGPTV-BAR (ATCC Deposito No: 77391), pGPTV-BLEO (ATCC Deposito No: 77392), y/o pPE1000 (ATCC Deposito No: 87573). La persona experimentada en la técnica apreciará que cualquiera de los vectores anteriores puede modificarse fácilmente para incluir u eliminar elementos específicos que puedan ser requeridos para la operabilidad. Otros vectores adecuados pueden ser fácilmente evidentes para la persona experimentada.

La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse por transformación biolística (Klein et al., Nature, 327: 70-73 (1987)), transfección mediada por PEG(Paskowski, et al., EMBO J., 3: 2717, (1984)), transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos cationicos, electroporación (Fromm, et al., PNAS,USA, 82: 5824 (1985)), transducción, infección dirigida por Agrobacterium tumefaciens, u otros método. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio tales como Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986).

Un polipéptido de esta invención para purificarse y recuperarse a partir de células recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía sobre fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea para la purificación la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC").

Los polipéptidos de la presente invención también pueden recuperarse a partir de: productos purificados de fuentes naturales, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células, bien aislados o directamente cultivados; productos procedimientos de síntesis química; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procaríotico o eucariotico, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos.

Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos la presente invención pueden ser glicosilados o puede ser no glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de metionina inicial modificado, en algunos casos como resultado de un proceso mediado por el huésped. Así, es bien conocido en la técnica de la metionina N –terminal codificada por el codón de iniciación de la traducción generalmente se elimina con alta eficiencia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucarióticas. Mientras que la metionina N -terminal en la mayoría de las proteínas también se elimina eficientemente en la mayoría de los procaríoticos, para algunas proteínas, este proceso de eliminación procaríotico es ineficiente dependiendo de la naturaleza del aminoácido al cual la metionina N –terminal esta enlazada de forma covalente.

Además de marcar células huésped que contiene los constructos de vector discutidos aquí, la divulgación también abarca células huésped primarias, secundarias e inmortalizadas que han sido manipuladas para eliminar o reemplazar material genético endógeno (por ejemplo, secuencias de codificación), y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias de polinucleótidos heterólogos), que están asociadas operativamente con los polinucleótidos de la invención, y que activa, altera y/o amplifica los polinucleótidos endógenos. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas en el arte para asociar operativamente regiones de control heterólogas (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias de polinucleótidos endógenos a través de recombinación homóloga, dando como resultado la formación de una nueva unidad de transcripción (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,641,670, ; emitida el 24 junio 1997 ; la patente de los Estados Unidos No. 5,733,761, emitida el 31 marzo 1998; publicación internacional No. WO96/29411, publicada el 26 septiembre 1996; publicación internacional No. WO 94/12650, publicada el 4 agosto 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932- 8935 (1989) ; and Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989).

Además, los polipéptidos, análogos, derivados y/o fragmentos pueden sintetizarse químicamente (véase, por ejemplo, Merrifield, 1963, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156).

Por ejemplo, los polipéptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de fase sólida, escindir de la resina y purificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (por ejemplo, véase (e. g., see Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N. Y., pp. 50-60). Los polipéptidos también pueden sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse mediante análisis o secuenciamiento de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N. Y., pp. 34-49; secuenciamiento de péptidos por espectrometría de masas, etc.). Adicionalmente, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos aminoácidos químicos como sustitución o además del polipéptido de la invención. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a los isómeros D de los aminoácidos comunes: ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ácido 4-diaminobutírico, Abu, ácido 2-diaminobutírico, ácido  $\gamma$ -Abu,  $\epsilon$ -Ahx-6-amino exanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropionico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglisina, cicloxilalanina,  $\beta$ -alanina, floroamino ácidos, aminoácidos de diseño tales como aminoácidos  $\beta$ -metilo, aminoácidos C  $\alpha$ -metilo, aminoácidos N.  $\alpha$ -metilo y aminoácidos análogos en general. Adicionalmente, el aminoácido puede ser D (dextrorrotatorio) o L (levorrotatorio).

La manipulación de las secuencias de polipéptidos de la invención pueden hacerse a nivel de proteína. Incluidos dentro del alcance de la invención están los polipéptidos de la invención, que son modificados en forma diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores, ruptura proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero limitándose a, ruptura química específica mediante bromuro cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa v8, NaBh4, acetilación, formulación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

Además, la divulgación abarca modificaciones postranlacionales adicionales que incluyen, por ejemplo, la adición de unidades estructurales o cadenas de carbohidratos enlazadas a N o enlazadas a O, la adición de marcadores detectables que pueden ser fluorescentes, radioisotópicos, enzimáticos, en su naturaleza, la adición de fragmentos de péptidos etiquetados con epítipo (por ejemplo, FLAG, HA, GST, tiorredoxina, proteína enlazante de la maltosa), enlazamiento de etiquetas de afinidad tales como biotina y/o estreptavidina, el enlazamiento covalente de unidades estructurales químicas al esqueleto de aminoácidos, el procesamiento N o C terminal de los extremos de los polipéptidos (por ejemplo, procesamiento proteolítico), eliminación del residuo de metionina N terminal, etc.

Adicionalmente, la divulgación abarca la derivación química de los polipéptidos de la presente invención, preferiblemente cuando el producto químico es un residuo polimerico hidrofílico.

5 Polímeros hidrofílicos de ejemplo, incluyendo derivados, pueden ser aquellos que incluyen polímeros en los cuales las unidades repetidas contienen uno o más grupos hidroxilo (polímeros polihidroxilo), incluyendo por ejemplo, poli (alcohol vinílico); polímeros en los cuales las unidades repetitivas contienen uno o más grupos amino (polímeros de poliamina), incluyendo por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas y lipoproteínas, tales como albumina y lipoproteínas naturales. Polímeros en los cuales las unidades repetitivas contienen uno o más grupos carboxi (polímeros de policarboxi), incluyendo, por ejemplo, carboximetil celulosa, ácido algínico y sales de los mismos, tales como alginato de sodio y calcio (glucosaminoglicanos y sales de los mismos, incluyendo sales del ácido hialurónico, derivados fosforilados y sulfonato de carbohidratos, material genético, tal como interleucina-2 e interferon, y oligómeros de fosforotioato; y polímeros en los cuales las unidades repetitivas contienen una o más unidades estructurales sacárido (polímeros polisacáridos), incluyendo, por ejemplo, carbohidratos.

15 El peso molecular de los polímeros hidrofílicos puede variar, y generalmente entre 50 hasta aproximadamente 5 millones, con polímeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 50,000 como preferidos. Polímeros más preferidos tiene un peso molecular de aproximadamente 150 hasta aproximadamente 10,000, siendo preferidos con pesos moleculares de 200 hasta aproximadamente 8000.

20 Los polímeros preferidos adicionales que pueden ser usados para derivar polipéptidos de la invención, incluyen, por ejemplo, poli (etilenglicol) (PEG), poli (vinilpirrolidina), polioxómeros, polisorbato y poli (alcohol vinílico), siendo particularmente preferidos los polímeros PEG. Preferidos entre los polímeros PEG son los primeros PEG que tienen un peso molecular que va desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 10,000. Más preferiblemente, los polímeros PEG tienen un peso de un peso molecular de aproximadamente 200 hasta aproximadamente 8000, siendo aún más preferidos PEG 2000, PEG 5000 y PEG 8000, que tienen pesos moleculares de 2000, 5000 y 8000, respectivamente.

25 Otros polímeros hidrofílicos adecuados, además de los ejemplificados más arriba, serán evidentes fácilmente para una persona experimentada en la técnica con base en la presente de la divulgación. En general, los polímeros pueden incluir polímeros que pueden estar enlazados a los polipéptidos de la invención a través de reacciones de alquilación o acilación.

30 Como sucede con los diversos polímeros ejemplificados más arriba, se contempla que los residuos poliméricos pueden contener grupos funcionales además de, por ejemplo, los involucrados típicamente en el enlace de los residuos poliméricos a los polipéptidos de la presente invención. Tales funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos carboxilo, amina, hidroxilo y tiol. Estos grupos funcionales sobre los residuos poliméricos pueden hacerse reaccionar y posteriormente, se desea, con materiales que son en general reactivos con tales grupos funcionales y que pueden ayudar en apuntar a los tejidos específicos en el cuerpo o incluyendo, por ejemplo, tejidos deseados. Materiales de ejemplo que pueden hacerse reaccionar con los grupos funcionales adicionales incluyen, por ejemplo, proteínas, incluyendo anticuerpos, carbohidratos, péptidos, glicopéptidos, glicolípidos, lectinas y nucleocidos.

35 Además de los residuos de polímeros hidrofílicos, el compuesto químico utilizado para derivar los polipéptidos de la presente invención puede ser un residuo de sacárido. Sacáridos de ejemplo que pueden ser derivados incluyen, por ejemplo, monosacáridos o alcoholes de azúcar, tales como, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, fructosa, sorbitol, manitol, sedoheptulosa, siendo monosacáridos preferidos fructosa, manosa, xilosa, arabinosa, manitol y sorbitol; y de sacáridos, tales como lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa.

40 Otros sacáridos incluyen, por ejemplo, inositol y grupos de cabeza de gangliósido. Otros sacáridos adecuados, además de los ejemplificados más arriba, serán fácilmente evidentes para el experimentado en la técnica con base en la presente divulgación. En general, los sacáridos que pueden ser utilizados para la derivación incluyen sacáridos que pueden ser enlazados a los polipéptidos de la invención a través de reacciones de alquilación o acilación.

45 Además, la divulgación también abarca la derivación de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, con lípidos (incluyendo, cationicos, anionicos, polimerizados, cargados, sintéticos, saturados, insaturados y cualquier combinación de los anteriores, etc.) agentes estabilizantes.

50 La divulgación abarca la derivación de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, con compuestos que puede servir como una función estabilizadora (por ejemplo, para incrementar la vida media de los polipéptidos en solución, para hacer los polipéptidos más solubles en agua, para incrementar el carácter hidrofílico o hidrófobo de los polipéptidos, etc.). Los polímeros útiles como materiales estabilizadores pueden ser de origen natural, semisintético (naturales modificados) o sintéticos. Polímeros naturales de ejemplo incluyen polisacáridos de origen natural, tales como, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, axilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenato, galactocarolosa, ácido péctico, pectinas, incluyendo amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, glucosa, poliglucosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantina, almidón y diversos otros homopolímeros o heteropolímeros tales como los que contienen una o más de las siguientes aldosas, cetosas, ácidos o aminas: eritosa, treosa, ribosa, arabinosa, axilosa, lixosa, alosa, altrosa,

5 glucosa, dextrosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrolosa, ribulosa, axilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trealosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteina, tirosina, aspargina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, licina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, y ácido neurmínico y derivados de origen natural de los mismos. De acuerdo con lo anterior, los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas tales como albumina, polialginatos y polímeros polilactido-coglicolido. Polímeros semisintéticos de ejemplo incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa. Polímeros sintéticos de ejemplo incluyen polifosfazenos, hidroxiapatitas, polímeros de fluoroapatita, polietilenos (tales como, por ejemplo polietilenglicol (incluyendo por ejemplo, la clase de compuestos denominados como pluronics, RMT, comercialmente disponibles de BASF, Parsinppany, NJ.), polietileno, y tereftalato de polietileno), polipropilenos (tales como, por ejemplo polipropilenglicol), poliuretanos (tales como, por ejemplo, polivinilalcohol (PVA), cloruro de polivinilo y polivinilpirrolidona), poliamidas incluyendo nilón, poliestireno, ácidos polilácticos, polímeros de hidrocarburos fluorados, polímeros de carbono fluorado (tales como, por ejemplo politetrafluoroetileno), acrilato, metacrilato y polimetacrilato y derivados de los mismos. Los métodos de la preparación de polipéptidos derivados de la invención que emplean polímeros compuestos estabilizantes serán fácilmente evidentes para la persona experimentada en la técnica, a la vista la presente obligación, cuando se acopla con información conocida la técnica, tal como la descrita y referida en Unger, patente de los Estados Unidos No. 5,205,290.

20 Adicionalmente, la divulgación abarca modificaciones adicionales de los polipéptidos de la presente invención. Tales modificaciones adicionales son conocidas en la técnica, y se proporcionan específicamente, además de los métodos de derivación, etc., en la patente de los Estados Unidos No. 6.028.066.

25 Usos de los Polinucleótidos

Cada uno de los polinucleótidos identificados aquí puede utilizarse de diversas formas como reactivos. La siguiente descripción será considerada a manera de ejemplo que utiliza técnicas conocidas.

30 Los polinucleótidos de la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. Existe una necesidad permanente de identificar nuevos marcadores de cromosomas, puesto que actualmente hay disponibles pocos reactivos marcadores de cromosomas con base en los datos de secuencias reales (polimorfismos repetidos). Cada polinucleótidos la presente invención puede utilizarse como un marcador de cromosomas.

35 Para resumir, las secuencias pueden ser mapeadas en cuanto a sus cromosomas preparando los cebadores de PCR (preferiblemente 15 -25 bp) de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: X. Los cebadores pueden ser seleccionados utilizando análisis por ordenador de manera que los cebadores no barran más de un exón predicho en el ADN genómico. Estos cebadores se utilizan entonces para la selección por PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Solamente estos híbridos que contienen genes humanos correspondientes a SEQ ID NO: X producirán un fragmento amplificado.

40 De la misma forma, los híbridos somáticos proporcionan un método rápido para mapear por PCR los polinucleótidos en cuanto a cromosomas particulares. Tres o más clones pueden asignarse por día utilizando un ciclizador térmico sencillo. Además, la sublocalización de los polinucleótidos puede alcanzarse con paneles de fragmentos específicos de cromosomas. Otras estrategias de mapeo de genes que pueden usarse incluyen hibridación in situ, preselección con cromosomas marcados escogidos por flujo y preselección por hibridación para construir bibliotecas de ADNc específicas de cromosomas.

45 La localización cromosómica precisa de los polinucleótidos también puede alcanzarse utilizando hibridación con fluorescencia in situ (FISH) de una distribución cromosómica en metafase. Esta técnica utiliza polinucleótidos tan cortos como 500 a 600 bases; sin embargo, se prefiere polinucleótidos de 2000 – 4000bp. Para una revisión esta técnica, véase Verma et al., "Human: a Manual of Basic Techniques," Pergamon Press, New York (1988).

50 Para el mapeo de cromosomas, pueden utilizarse los polinucleótidos individualmente (para marcar un cromosoma individual o un sitio individual en el cromosoma) o en paneles (para marcar sitios múltiples y/o cromosomas múltiples). Los polinucleótidos preferidos corresponden a las regiones no codificantes de los ADNc porque las secuencias codificantes se conserva más probablemente dentro de familias de genes, incrementando así la probabilidad de hibridación cruzada durante el mapeo cromosómico.

55 Una vez que se ha mapeado un polinucleótido para una localización cromosómica precisa, la posición física del polinucleótido puede utilizarse en análisis de enlazamiento. El análisis de enlazamiento establece la coherencia entre una localización cromosómica y la presentación de una enfermedad en particular. Los datos de mapeo de enfermedad son conocidos en la técnica. Asumiendo una resolución de mapeo de una megabase y un gen por 20kb, un ADNc localizado con precisión con respecto a una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de 50 -500 genes causantes potenciales.

65

Así, una vez que se ha establecido una coherencia, las diferencias en el polinucleótido y el correspondiente gen entre los organismos afectados y no afectados puede examinarse en ese momento. Primero, se examinan las alteraciones estructurales visibles en los cromosomas tales como eliminaciones o translocaciones en distribuciones de cromosomas o por PCR. Si no existen alteraciones estructurales, se establece la presencia mutaciones puntuales. Las mutaciones observadas en algunos o en todos los organismos afectados, pero no en los organismos normales, indica que la mutación puede causar la enfermedad. Sin embargo, un secuenciamiento completo del polipéptido y el gen correspondiente a partir de organismos normales se requiere para distinguir la mutación de un polimorfismo. Si se identifica un nuevo polimorfismo, este polipéptido polimórfico puede utilizarse para análisis de enlazamiento adicionales.

Adicionalmente, la expresión incrementada o disminuida del gen de organismos afectados en comparación con organismos no afectados puede establecerse utilizando los polinucleótidos de la presente invención. Cualquiera de esas alteraciones (expresión alterada, reordenamiento cromosómico o mutación) puede utilizarse como un marcador de diagnóstico o pronóstico.

Así, la invención también proporciona un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de un trastorno, que involucra la medición del nivel de expresión de los polinucleótidos de la presente invención en células o fluidos corporales de un organismo y la comparación del nivel de expresión del gen medido con un nivel estándar del nivel de expresión del polinucleótido, con lo cual un incremento o decremento en el nivel de expresión del gen en comparación con el estándar es indicativo de un trastorno.

Por "medir el nivel de expresión de un polinucleótido la presente invención" se entiende medir cualitativamente cuantitativamente o estimar el nivel del polipéptido de la presente invención o el nivel del ARNm que codifica el polipéptido de una primera muestra biológica bien sea directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de proteína absoluto o el nivel de ARNm) o también relativamente (por ejemplo, comparando el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferiblemente, el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm de la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm estándar, siendo tomado el estándar a partir de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o se determina promediando niveles de una población de organismos que no tienen un trastorno. Como será evidente en la técnica, una vez que un nivel de polipéptido o de ARNm estándar es conocido, puede utilizarse repetidamente como estándar para comparación.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un organismo, fluidos corporales, línea celular, cultivo de tejidos, u otra fuente que contengan al polipéptido o ARNm de la presente invención. Como se indicó, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como los siguientes ejemplos no limitantes, floemas, xilemas, fluidos secretados, néctar, fluido modular, fluido appresorium, fluido de úlceras, fluido de vesícula, zumo de frutas, fluido tricoma, fluido de las vacuolas, fluido de los plástidos, fluido citosólico, sudados de raíz, el fluido intersticial, etc.) que contengan el polipéptido la presente invención, y otras fuentes de tejidos que expresan el polipéptido de la presente invención (tales como los siguientes ejemplos no limitantes, raíces, tallo, meristema apical, hojas, flores, pétalos). Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de dos plantas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede encontrarse métodos para aislar fluido intersticial de células y tejidos vegetales, por ejemplo, en la publicación internacional No. WO 00/09725. Cuando la muestra biológica debe incluir ARNm, se prefiere una fuente de biopsia de tejido.

El método o métodos provistos más arriba pueden aplicarse preferiblemente en un método diagnóstico y/o en kits en los cuales los polinucleótidos y/o polipéptido se enlazan a un soporte sólido. En un método de ejemplo, el soporte puede ser un "chip de genes" o un "chip biológico" tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5,837, 832, 5, 874, 819 y 5, 856, 174. Adicionalmente, un chip de genes con polinucleótidos de la presente invención enlazados puede ser utilizado para identificar polimorfismo entre las secuencias de polinucleótidos, con polinucleótidos aislados a partir de un sujeto de prueba. El conocimiento de tales polimorfismos (esto es su localización, así como, su existencia) serían beneficiosos en la identificación de los loci de identificación de enfermedades para muchos trastornos, incluyendo enfermedades y condiciones proliferativas. Tal método se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos 5,858,659 y 5,856,104.

La presente divulgación abarca polinucleótidos de la presente invención que sintetizan químicamente, o se reproducen como ácidos nucleicos péptidicos (PNA) o de acuerdo con otros métodos conocidos en la técnica. El uso de PNAs serviría como la forma preferida si se incorporan los polinucleótidos en un soporte sólido, o en un chip. Para los propósitos de la presente divulgación, un ácido nucleico péptidico (PNA) es un tipo poliamida del análogo del ADN de las unidades monoméricas para adenina, guanina, timina y citosina y están disponibles comercialmente (Perceptive Biosystems). Ciertos componentes del ADN, tales como fósforo, óxidos de fósforo y derivados de deoxirribosa, no están presentes en los PNA. Tal como lo divulga P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, Science 254,1497 (1991); and M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen, Nature 365,666 (1993), los PNA se enlazan específicamente y firmemente a las cadenas de ADN complementarias y no son degradadas por las nucleasas. En efecto, el PNA se enlaza más fuertemente al ADN de lo que hace el propio ADN. Esto probablemente se debe a que no hay repulsión electrostática entre las dos cadenas, y también el esqueleto de poliamida es más flexible.

Debido a esto, los dúplex PNA/ADN se enlazan bajo un rango más amplio de condiciones de restricción que los duplex ADN/ADN, haciendo más fácil llevar a cabo hibridización múltiple. Pueden utilizarse cebadores más pequeños que con el ADN debido a las características de enlazamiento más fuertes de los híbridos PNA: ADN.

5 Además, es más probable que puede determinarse errores en las bases individuales determinados con hibridización de PNA/ADN porque un simple error que en PNA/ADN 15-mero disminuye. Infusión (T.sub.m) en 8°-20°C, contra 4 ° -16°C  
 10 para el dúplex ADN/ADN 15 -mero. También la ausencia de grupos de carga en el PNA significa que la hibridización puede hacerse con fuerzas iónicas más bajas y se reduce la posible interferencia por parte de la sal durante el análisis.

Además de lo anterior, se puede utilizar un polinucleótido para controlar la expresión genética a través de formación de hélices triples o ADN o ARN antisentido. Las técnicas antisentido se discuten, por ejemplo, en Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).

15 La formación de hélices triples se discute, por ejemplo, en Lee et al., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988); and Dervan et al., Science 251: 1360 (1991). Ambos métodos se basan en el enlazamiento del polinucleótido a un ADN o ARN complementario. Para estas técnicas, los polinucleótidos preferidos son usualmente oligonucleótidos de 20 a 40 bases de longitud y complementarios bien sea a la región del gen involucrada en la transcripción (hélice triple-véase Lee et al., NuCl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988) ; and Dervan et al., Science 251: 1360 (1991)) o el ARNm por sí mismo (antisentido-Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). La formación de hélice triple da como resultado de forma óptima un corte de la transcripción de ARN a partir del ADN, mientras que la hibridización del ARN bloquea la traducción de una molécula de ARNm en polipéptido. Ambas técnicas son efectivas en sistemas modelo, la información divulgada aquí puede ser utilizada para diseñar polinucleótidos antisentido o de hélice triple en un esfuerzo para tratar o prevenir una enfermedad.

25 La presente divulgación abarca la adición de una señal de localización nuclear, enlazados operativamente el extremo 5', extremo 3', o cualquier localización entre ellos, a cualquiera de los oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de hélice triple, ribozimas, oligonucleótidos de PNA, y/o polinucleótidos de la presente divulgación. Véase por ejemplo, G. Cutrona, et al., Nat. Biotech., 18: 300-303, (2000).

35 Los polinucleótidos de la presente invención también son útiles en terapia de genes. Una meta de la terapia de genes es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectuoso, para corregir el defecto genético. Los polinucleótidos divulgados en la presente invención de ofrecen un medio para apuntar hacia dichos defectos genéticos de una forma altamente precisa. Otra meta es insertar un nuevo gen que no estaba presente en el genoma huésped produciendo por lo tanto una nueva ruta en la célula huésped. En un ejemplo, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para construir oligonucleótidos de ARN/ADN quiméricos correspondientes a dichas secuencias, específicamente diseñadas para introducir mecanismos de reparación de errores en la célula huésped en una planta por inyección sistémica, por ejemplo (Bartlett, R. J., et al., Nat. Biotech, 18: 615-622 (2000)). Tales oligonucleótidos de ARN/ADN podrían ser diseñados para corregir defectos genéticos en ciertas cepas huésped, y/o para introducir rutas deseadas en una planta huésped (por ejemplo, introducción de un polimorfismo específico con un gen endógeno que corresponda a un polinucleótido de la presente invención que pueda conferir resistencia a ciertos herbicidas, pesticidas, fungicidas, etc.). Alternativamente, la secuencia polinucleótidos de la presente invención puede utilizarse para construir oligonucleótidos dúplex correspondientes a dicha secuencia, diseñados específicamente para corregir defectos genéticos en ciertas cepas huésped, y para introducir rutas deseadas en la planta huésped (por ejemplo, introducción de un polimorfismo específico con un gen endógeno correspondiente a un polinucleótido presente invención que pueda conferir resistencia ciertos herbicidas, pesticidas, fungicidas, etc.). Tales métodos de utilizar oligonucleótidos dúplex son conocidos en la técnica y están abarcados por la presente invención (véase EP 1007712,).

45 Los polinucleótidos también son útiles para identificar organismos a partir de muestras biológicas diminutas. El ejército de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso del polimorfismo de restricción de longitud de fragmento (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, un ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción y se prueba sobre un Southern blot para producir bandas únicas para identificar un personal. Este método no sufre de las limitaciones actuales de los "Dog Tags" que pueden perderse, conmutarse o ser robados, haciendo difícil la identificación positiva. Los polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse como marcadores de ADN adicionales para RFLP.

60 Los polinucleótidos de la presente invención también puede utilizarse con RFLP alternativos determinando la secuencia de ADN actual base por base de porciones seleccionadas de un genoma de un organismo. Éstos secuestros puede utilizarse para preparar cebadores de PCR para amplificar y aislar al ADN seleccionado que luego puede ser secuenciado. Utilizando esa técnica, pueden identificarse organismos puesto que cada organismo tiene un conjunto único de secuencias de ADN. Una vez que una base de datos de identificación única se haya establecido para un organismo, la identificación de ese organismo, vivo o muerto, puede hacerse a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas. De la misma forma, los polinucleótidos de la presente invención

pueden utilizarse como marcadores polifórmicos, además de, la identificación de células y/o tejidos vegetales transformados o no transformados.

5 También hay necesidad de reactivos capaces de identificar la fuente de un tejido particular. Tal necesidad surge, por ejemplo, cuando se presentan tejidos de origen desconocido.

10 Los reactivos apropiados pueden comprender, por ejemplo, cebadores de ADN o cebadores específicos para un tejido en particular preparado a partir de las secuencias de la presente invención. Los paneles en tales reactivos pueden identificar tejido por especie y/o por tipo de órgano. De forma similar, estos reactivos pueden utilizarse para seleccionar cultivos de tejidos por contaminación. Adicionalmente, tal como se mencionó más arriba, tales reactivos pueden ser utilizados para seleccionar y/o identificar células y/o tejidos vegetales transformados y no transformados.

15 Además, los polinucleótidos de la presente invención, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención, el ADNc contenido en el depósito, incluyendo variantes y/o fragmentos en el mismo, pueden ser útiles para modelar, inhibir,, incrementar, decrementar o introducir las siguientes rutas no limitantes en una planta. Tolerancia a la sequía, tolerancia a UV, desarrollo de flores, síntesis de terpenos, tolerancia al estrés a biótico, tolerancia al estrés por calor, tolerancia a estrés por frío, tolerancia a estrés nutricional, tolerancia a estrés xenobiótico, capacidad de almacenamiento proteínas, capacidad de almacenamiento de aceites, contenido de aminoácidos, composición de aminoácidos, capacidad de almacenamiento de carbohidratos, contenido de aceites, composición de aceites, contenido de carbohidratos, composición de carbohidratos, contenido de fibra, composición de la fibra, contenido de metabolitos, composición de los metabolitos, contenido de vitaminas y/o composición de vitaminas. Los polinucleótidos de la invención, también pueden ser útiles para modular el rendimiento de las plantas, el desarrollo de las plantas, la diferenciación de las plantas, el crecimiento de las raíces, la morfología de las raíces, el color de la planta, el aroma la planta, el sabor de la planta, la palatabilidad del tejido vegetal, las propiedades organolepticas de la planta, puede ser útil en la fitorremediación y/o la defensa de las plantas. Además, los polipéptidos de la invención también pueden ser útiles en la modulación de la capacidad de las plantas para servir como neutriceuticos, farmacéuticos o fitoceuticos vegetales. Alternativamente, los polipéptidos de la invención también pueden ser útiles en la modulación de las plantas para producir neutriceuticos, farmacéuticos o fitoceuticos vegetales de origen bien sea endógeno o exógeno (por ejemplo, de otra especie vegetal, un humano, un mamífero, un animal u otro organismo). En estos contextos, el término "planta" puede ser aplicado para indicar cualquier célula vegetal, tejido vegetal, fluido vegetal, o característica vegetal, que incluye estructuras de infección de vegetales, que pueden incluir, pero no se limitan a un appresorium, un vesícula, un fluido de úlceras y/o nódulos. En estos contextos, el término "modular" o aplicarse para indicar el incremento, descenso, introducción de, inhibición de, pérdida completa de, o sobre expresión de una ruta específica o característica específica tal como se describió más arriba aquí.

40 Como mínimo, lo polinucleótidos de la presenten invención puede utilizarse como marcadores de peso molecular en geles Southern, como cebadores de diagnostico para la presencia de ARNm específico en un tipo celular particular, como un cebador para "sustraer" secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de polinucleótidos novedosos, para seleccionar y hacer oligomeros para unir a un "chip de genes" u otro soporte, para elevar los anticuerpos anti ADN, utilizando técnicas de inmunizacion de ADN, y como un antígeno para elicitar una respuestas inmune.

45 Usos de los Polipéptidos

Cada uno de los polipéptidos identificados aquí puede utilizarse de diversas maneras. La siguiente descripción debería ser considerada a titulo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

50 Un polipéptido de la presente invención puede ser usado para probar niveles de proteína en una muestra biológica utilizando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de proteínas en tejidos puede estudiarse con métodos inmunohistologicos clásicos (Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)).

55 Otros métodos basados en anticuerpos útiles para la detección de expresión genética de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunsorbente enlazado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Marcadores de prueba de anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (125I, 121I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (112In), y tecnecio (99mTc), y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

60 Además de probar lo niveles de proteína en una muestra biológica, las proteínas también pueden detectarse in vivo mediante imágenes. Los marcadores de anticuerpos a marcadores para imágenes in vivo de proteína se incluyen los detectables por radiografía de rayos X, NMR o ESR. Para la radiografía por rayos X, los niveles adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son excesivamente nocivos para el sujeto. Marcadores adecuados para NMR y ESR incluyen aquellos que tienen una característica de giro detectable, tales como el deuterio, el cual puede incorporarse en el anticuerpo marcando los nutrientes para el hibridoma relevante.

65

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para una proteína que ha sido etiquetado con una unidad estructural detectable por imágenes, tal como un radio isotopo (131I, 112In, 99mTc), una sustancia radioopaca o un material detectable por resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parentérica, subcutánea o intraperitoneal) en el organismo.

Se entiende en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de imágenes utilizado determinara la cantidad de unidad estructural para imagen necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de una unidad estructural de radioisótopo, la cantidad de radioactividad inyectada variara normalmente desde aproximadamente 5 a 20 milicurios de 99mTc. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumulara entonces preferencialmente en la localización de células que contengan la proteína específica. Las imágenes de tumores in vivo se describen en S. W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging : The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)). Tales métodos son igualmente aplicables a plantas.

Así como la divulgación aporta un método diagnóstico de un trastorno, que involucra (a) probar la expresión en un polipéptido de la presente invención en células o fluido corporal de un organismo; (b) comparar el nivel de la expresión genética con un nivel de expresión estándar de un gen, con lo cual un incremento o descenso en la expresión del gen del polipéptido probado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno.

Adicionalmente, los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento, detección, y/o prevención de una enfermedad o un estado de una enfermedad. Por ejemplo, un organismo puede recibir la administración de un polipéptido de la presente invención en un esfuerzo para sustituir niveles ausentes o disminuidos del polipéptido, para complementar niveles ausentes o disminuidos de un polipéptido diferente, para inhibir la actividad de un polipéptido, bien sea directa o indirectamente, para activar la actividad de un polipéptido, bien sea directa o indirectamente (por ejemplo, enlazándolo a un receptor), para reducir la actividad de un receptor de enlace a una membrana compitiendo por el por el ligando libre, o para llevar una respuesta deseada (por ejemplo, inducción de la diferenciación, crecimiento, senescencia, germinación, etc.).

De la misma forma como los anticuerpos dirigidos a un polipéptido de la presente invención pueden utilizarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar una enfermedad. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo dirigido a un polipéptido de la presente invención puede enlazar y reducir la sobreproducción del polipéptido. De la misma forma, la administración de un anticuerpo puede activar el polipéptido, tal como mediante enlazamiento a un enlace polipéptidico a una membrana (receptor).

Y finalmente, los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse como marcadores de peso molecular en geles SDS – PAGE o sobre columnas de filtración por gel de tamiz molecular utilizando métodos bien conocidos para el experto en la técnica. Los polipéptidos pueden también ser utilizados para elevar los anticuerpos, los cuales a su vez se utilizan para medir la expresión de proteína desde una célula recombinante, como manera de establecer la transformación de la célula huésped. Adicionalmente, los polipéptidos de la presente invención pueden ser usados para probar las siguientes actividades biológicas.

#### Métodos Transgénicos

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con la introducción de secuencias de ácidos nucleico (ADN,ARN y ADN o ARN antisentido) en un organismo, preferiblemente una planta, para alcanzar la expresión de un polipéptido de la presente invención. Este método requiere un polinucleótido que codifica para un polipéptido de la invención operativamente enlazado a un promotor y cualquiera otros elementos genéticos necesarios para la expresión del polipéptido por un tejido objetivo. Tales técnicas transgénicas y de administración son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, W090/11092.

Así, por ejemplo, las células de una planta pueden ser manipuladas con un polinucleótido (ADN o ARN) que comprende un promotor operativamente enlazado a un polinucleótido de la invención ex vivo, con las células manipuladas introducidas entonces de retregreso en la planta para "tratar" la deficiencia. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y son igualmente aplicables a plantas. Por ejemplo, véase Belldegrun et al., J. Natl. Cancer Inst., 85 : 207-216 (1993); Ferrantini et al., Cancer Research, 53: 107-1112 (1993); Ferrantini et al., J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura et al., Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, et al., Human Gene Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, et al., Gene Therapy 4: 1246-1255 (1997); and Zhang, et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996).

Como se discute en más detalle más abajo, los constructos de polinucleótidos pueden ser administrados por cualquier método que libere materiales en las células de un organismo, tal como, inyección biológica en los tejidos vegetales (meristema apical, raíz, flor, tallo y similares). Los constructos de polinucleótidos pueden administrarse en un líquido o vehículo acuoso aceptable.

- 5 En una realización, el polinucleótido de la invención es administrado como un polinucleótido desnudo. El termino polinucleótido “desnudo”, ADN o ARN se refiere a las secuencias que están libres de cualquier vehículo de administración que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes de precipitaciones similares. Sin embargo, los polinucleótidos de la invención también pueden administrarse en formulación en liposomas y formulaciones con lipofectina y los mismos pueden ser preparados por métodos bien conocidos para los expertos en al técnica. Tales métodos de se describen por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,593,972,5,589,466, y 5,580,859.
- 10 Los constructos del vector de polinucleótidos de la invención pueden integrarse en la mayoría de los genomas y pueden replicarse. Los vectores apropiado incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 pSG disponible de Stratagene ; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia ; y pEFI/V5, pcDNA3. 1, y pRc/CMV2 disponibles de Invitrogen. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para la persona experimentada.
- 15 Cualquier promotor fuerte conocido para los expertos en al técnica puede utilizarse para conducir la expresión de la secuencia de polinucleótidos de la invención. Los promotores adecuados incluyen los promotores 35S, 34S y actina, además de cualquier otro promotor conocido en la técnica y/o descrito aquí en algún lugar. El promotor también puede ser un promotor nativo para los polinucleótidos de la invención.
- 20 A diferencia de otras técnicas de terapia genética, una ventaja principal de introducir las secuencias de ácidos nucleicos desnudos en las células objetivo es la naturaleza transitoria de la síntesis del polinucleótido en la células. Estudios han demostrado que las secuencias de ADN no replicantes pueden introducirse en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado por periodos de hasta seis meses.
- 25 La ruta preferida de administración es por la ruta aparenterica de inyección en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también pueden utilizarse otras rutas parentericas. Además, los constructos de ADN desnudo pueden ser administrados al sistema circulatorio de las plantas por inyección directa.
- 30 Los polinucleótidos desnudos son administrados por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitándose a, inyección con aguja en el sitio de administración, administración tópica y las así llamadas “pistolas de genes”. Estos métodos de administración son conocidos en al técnica.
- 35 Los constructos también pueden ser administrados en vehículos de administración tales como secuencias virales, partículas virales, formulaciones en liposomas, lipofectina, agentes de precipitación, etc.. Tales métodos de administración son conocidos en la técnica.
- 40 Los constructos de polinucleótidos de la invención pueden ser complejados en una preparación liposomica. Las preparaciones liposomicas para uso en la invención presente incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), anionicas (cargadas negativamente) y neutras.
- 45 Sin embargo, los liposomas catiónicos son preferidos particularmente por que puede formarse un complejo de cargo cohesionado entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianionico. Los liposomas catiónicos han demostrado mediar la administración intracelular del ADN plasmido (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7416 (1987)); mRNA (Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6077-6081 (1989)); y factores de transcripción purificados (Debs et al., J. Biol. Chem., 265: 10189-10192 (1990)), en forma funcional.
- 50 Los liposomas catiónicos son fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N [1-2, 3-dioleoyloxy) propyl]- N, N, N-triethylammonium (DOTMA) son particularmente útiles y están disponibles bajo la marca comercial Lipofectina de GIBCO BRL, Grand Island, N. Y. (véase, también Felgner et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 84: 7413-7416 (1987) ). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen trasfectasa (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer).
- 55 Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, la publicación PCT NO: WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP 1,2- bis (oleoiloxi)-3- (trimetilammonio) propano). La preparación de los liposomas de DOTMA esta esta explicada en la literatura, véase por ejemplo, Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413- 7417. Pueden utilizarse métodos similares para preparar liposomas a partir de otro materiales lipídicos catiónicos.
- 60 De la misma forma, los liposomas aniónicos y neutros son fácilmente disponibles, tales como los Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala), o pueden prepararse fácilmente utilizando materiales fácilmente disponibles.
- Tales materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil, etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida de DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas.
- 65 Los métodos para hacer liposomas utilizando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG) y dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE) comercialmente disponibles pueden utilizarse en diversas combinaciones para hacer liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol

5 Así, por ejemplo, los vesiculos de DOPG/DOPC pueden prepararse secando 50 mg de DOPG y DOPC bajo una corriente de gas nitrógeno en un vial de sonicación. La muestra se coloca bajo una bomba de vacío durante la noche y se hidrata el día siguiente con agua desionizada. La muestra luego se somete a sonicación durante dos horas en un vial tapado, utilizando un sonicador Heat Systems modelo 350 equipado con una sonda de copa invertida (tipo baño) en la posición máxima mientras que el baño se circula a 15S. Alternativamente, los vesiculos cargados negativamente pueden prepararse sin sonicación para producir vesiculos multilamelares o por extrusión a través de membranas de nucleoporos para producir vesiculos unilamelares de tamaño discreto. Otros métodos son conocidos y disponibles para los expertos en la técnica.

10 Los liposomas pueden comprender vesiculos multilamelares (MLVs), vesiculos unilamelares pequeños (SWs), o vesiculos unilamelares grandes (LUVs), siendo preferidos los SUVs. Los diversos complejos de liposoma – ácido nucleico se preparan utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Véase, por ejemplo, Straubinger et al., *Methods of Immunology*, 101: 512-527 (1983). Por ejemplo, los MLVs que contienen ácido nucleico pueden prepararse depositando una delgada película de fosfolípidos sobre las paredes de un tubo de vidrio e hidratando subsecuentemente con una solución del material que va a ser encapsulado. Los SUVs se preparan por sonicación extendida de los MLVs para producir una población homogénea de liposomas unilamelares. El material que va a ser atrapado se añade a una suspensión de MLV preformada y luego se somete a sonicación. Cuando se utilizan liposomas que contienen lípidos catiónicos, la película de lípidos seca se resuspende en una solución apropiada tal como agua estéril o una solución reguladora isotónica tal como Tris/ NaCl 10nM, se somete a sonicación y luego los liposomas preformados se mezclan directamente con el ADN. El liposoma y el ADN forman un complejo muy estable al enlazamiento de los liposomas cargados positivamente al ADN catiónico. Los SUVs encuentran uso con fragmentos pequeños de ácidos nucleicos, los LUVs se preparan mediante un cierto número de métodos bien conocidos en la técnica. Comúnmente los métodos usados incluyen quelación con CA2+EDTA (Papahadjopoulos et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 394: 483 (1975); Wilson et al., *Cell*, 17: 77 (1979)); inyección con éter (Deamer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 443: 629 (1976); Ostro et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76: 836 (1977); Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348 (1979)); diálisis detergente (Enoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 145 (1979)); y evaporación en fase reversa (REV) (Fraley et al., *J. Biol. Chem.*, 255: 10431 (1980); Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 145 (1978) ; Schaefer-Ridder et al., *Science*, 215:166 (1982)).

35 En general, la proporción de ADN a liposomas estará alrededor de 10:1 hasta aproximadamente 1:10.

Preferiblemente, la proporción será de aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5. más preferiblemente, la proporción estará alrededor de 3:1 hasta aproximadamente 1:3. Aun más preferiblemente, la proporción estará alrededor 1:1. La patente de los Estados Unidos No. 5,676,954 reporta la inyección de material genético, complejo con vehículos liposómicos catiónicos en ratones. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,897,355, 4,946,787, 5,049,386, 5,459,127, 5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, y la publicación internacional No. WO 94/9469 proporcionan lípidos catiónicos para en la transfección de ADN en células y mamíferos, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, y la solicitud internacional No: WO 94/9469 proporcionan métodos para administrar complejos ADN-lípidos catiónicos a mamíferos. Tales métodos son aplicables igualmente a plantas y esta dentro de la experiencia del técnico.

Las células pueden ser manipuladas, ex vivo o in vivo, utilizando una partícula retroviral que contiene ARN que comprende una secuencia que codifica los polipéptidos de la invención.

50 Se ha detectado que la integración retroviral ocurre en plantas con base en la identificación de una secuencia de pararetrovirus dentro del genoma del tabaco. Puesto que se determinó que tal integración ocurría en sitios de integración muy limitados, tales como punto pararetrovirus puede presentar un vehículo de transformación genética deseable para los polinucleótidos en la presente invención (Jakowitsch, J., et al., *PNAS* 96 (23): 13241-6 (1999).

El vector de plasmido retroviral se emplea para transducir líneas celulares de empaque para formar líneas celulares productoras. Ejemplos de células de empaque que pueden ser transfectadas incluyen, pero no se limitan a, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAml2, y DAN, descritas en Miller, *Human GeneTherapy*, 1: 5-14 (1990), la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células de empaque a través de cualquier medio conocido en la técnica. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, electroporación, el uso de liposomas, y precipitación con CaP04. En una alternativa, el vector de plasmido retroviral puede ser encapsulado en un liposoma, o acoplado a un lípido, luego administrado a un huésped.

60 La línea celular productora genera partículas del vector retroviral infeccioso que incluyen polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención. Tales partículas del vector retroviral pueden emplearse entonces para transducir las células eucarióticas, bien sea in vitro o in vivo. Las células eucarióticas transducidas expresarán los polipéptidos de la invención.

65

- 5 La presente divulgación también abarca la aplicación de retrotransposones a la transformación genética de las plantas. Los retrotransposones preferiblemente representarían retrotransposones con un rango de plantas huésped conocidas y comprenderían polinucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención. Muchos retrotransposones son conocidos en la técnica, algunos de los cuales son descritos por Bennetzen JL, Trends Microbiol., 4 (9): 347-53 (1996).
- 10 Otro método para terapia genética involucra la asociación operativa de secuencias de polinucleótidos de regiones de control heterólogas y endógenas (por ejemplo, la codificación de la secuencia del polipéptido interés) a través de recombinación homóloga (véase, por ejemplo, la patente los Estados Unidos 5,641,670, emitida el 24 junio 1997; la publicación internacional No. WO 96/29411, publicada el 26 septiembre 1996; la publicación internacional No: WO 94/12650, publicada el 4 agosto de 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 8932-8935 (1989); and Zijlstra et al., Nature, 342: 435-438 (1989).
- 15 Este método involucra la activación de un gen que está presente en las células objetivo, pero el cual normalmente no se expresan las células, o se expresa en un nivel más bajo del deseado.
- 20 Los constructos de polinucleótidos se hacen utilizando técnicas están conocidas en la técnica, que contiene el promotor con las secuencias objetivo flanqueando el promotor. Los promotores adecuados se describen aquí. La secuencia objetivo es suficientemente complementaria a una secuencia endógena para permitir la recombinación homóloga de la secuencia promotor-objetivo con la secuencia endógena. La secuencia objetivo estará suficientemente cerca del extremo 5' de la secuencia de polinucleótido endógena deseada de manera que el promotor estará operativamente enlazado a la secuencia endógena por recombinación homóloga.
- 25 El promotor y las secuencias objetivo pueden amplificarse utilizando PCR. Preferiblemente, el promotor amplificado contiene sitios enzimáticos de restricción distintos en los extremos 5' y 3'.
- 30 Preferiblemente, el extremo 3' de la primera secuencia objetivo contiene el mismo sitio enzimático de restricción que el extremo 5' del promotor amplificado el extremo 5' de la segunda secuencia objetivo contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' de promotor amplificado. El promotor amplificado y las secuencias objetivo son digeridos y ligados entre sí.
- 35 El constructo de la secuencia promotor -objetivo es administrado a las células, bien sea como un polinucleótido desnudo, o en conjunción con agentes de transformación -facilitación, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, virus completos, lipofección, agentes de precipitación, etc., descritos en más detalle más arriba. La secuencia promotor -objetivo P puede administrarse por cualquier método, incluyendo inyección directa con aguja, inyección intravenosa, administración tópica, infusión, aceleradores de partículas, etc.. Los métodos se describen en más detalle más abajo.
- 40 El constructo de la secuencia promotor -objetivo es tomado por las células. La recombinación homóloga entre el constructo y la secuencia endógena toda tiene lugar, tal como una secuencia endógena es colocada bajo el control del promotor. El promotor entonces conduce a la expresión de la secuencia endógena.
- 45 En un aspecto de la invención, preferiblemente, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención contienen una secuencia de señal secretora que facilita la secreción de la proteína. Típicamente, la secuencia de señal se posiciona en la región de codificación del polinucleótido que va a ser expresado hacia o en el extremo 5' de la región de codificación. La secuencia de señal puede ser homóloga o heteróloga al polinucleótido de interés y puede ser homóloga o heteróloga a las células que van a ser transformadas. Adicionalmente, la secuencia de señales puede ser sintetizada químicamente utilizando métodos conocidos en la técnica.
- 50 Cualquier modo de administración de cualquiera de los constructos de polinucleótidos antes descritos puesto que el modo da como resultado la expresión de una o más moléculas en una cantidad suficiente para proveer un efecto terapéutico. Esto incluye inyección directa con aguja, inyección sistémica, infusión, inyectoras violísticas, acelerables de partículas (esto es, "pistolas de genes"), depósitos de esponja de espuma gelificada, otros materiales de depósito comercialmente disponibles, bombas osmóticas (por ejemplo, minibombas Alza), y aplicación por decantación o tópica. Por ejemplo, la inyección directa de un plasmido desnudos precipitado con fosfato de calcio en el hígado de una rata y en el vaso de una rata de un plasmido recubierto de proteína en la vena portal ha dado como resultado la expresión genética del gen foráneo en los hígados de ratón (Kaneda et al., Science, 243: 375 (1989)). Además, la inyección directa de ADN desnudo ha sido reportada en plantas y está abarcada por la presente invención (Davey MR, et al., Plant Mol Biol, 13 (3): 273-85 (1989), y Potrykus I, Ciba Found Symp, 154: 198-212 (1990)).
- 55 60 Un método de administración local es por inyección directa. Una molécula recombinante de la presente invención complejada con un vehículo de administración se administra por inyección directa en o localmente dentro del área del sistema circulatorio de los organismos (por ejemplo, ploema, axilema, etc.). La administración localmente dentro del área del sistema circulatorio de los organismos se refiere a inyectar la composición en centímetros y preferiblemente, en milímetros dentro del sistema circulatorio del organismo.
- 65

Otro método de administración local para poner en contacto un constructo de polinucleótido de la presente invención en o alrededor de una herida quirúrgica o injerto. Por ejemplo, el constructo de polinucleótido puede ser utilizado como recubrimiento sobre la superficie de un tejido dentro de la herida o el constructo puede ser inyectado en áreas de tejido dentro de la herida.

5 Las composiciones terapéuticas útiles en la administración sistémica incluyen moléculas recombinantes de la presente invención complejadas con un vehículo objetivo de administración de la presente invención. Vehículos de administración adecuados para uso con la administración sistémica comprende liposomas que comprende ligandos para apuntar el vehículo a un sitio en particular.

10 Métodos propios para dirigirse sistémica, incluyendo inyección, aerosol, administración percutánea (tópica). Las inyecciones pueden llevar a cabo utilizando métodos estándar en la técnica. La administración por aerosol puede llevarse a cabo utilizando métodos estándar en la técnica (véase, por ejemplo, Sibling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 189: 11277-11281 (1992)). La administración tópica puede llevar a cabo mezclando un constructo de polinucleótido de la presente invención con un reactivo lipofílico (por ejemplo, DMSO) que es capaz de pasar por la piel.

20 La determinación y la cantidad efectiva de sustancia que va a ser administrada puede depender de un cierto número de factores que incluyen, por ejemplo, la estructura química y actividad biológica de la sustancia, la edad y peso de la planta o animal, la condición precisa que requiere tratamiento y su severidad, y la ruta de administración. La frecuencia de tratamientos depende de un número de factores, tales como la cantidad de constructos de polinucleótidos administrados por aplicación, así como la vida media de los polinucleótidos y polipéptidos (esto es, el periodo efectivo de aplicación). La cantidad precisa, número de aplicaciones y tiempo de las aplicaciones serán determinados por la aplicación deseada.

25 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse a cualquier organismo, preferiblemente a plantas. Las plantas preferidas, pueden incluir los siguientes ejemplos de limitantes, incluyendo cebada, avena, centeno,, sorgo, guisantes, girasol, tabaco, algodón, petunias, tomate, brócoli, lechuga, manzana, ciruelas, naranjas y limón, y más preferiblemente arroz, maíz, canola, trigo, remolacha de azúcar, caña de azúcar y soja, además de otras plantas conocidas en la técnica y referenciadas más particularmente aquí (por ejemplo, Tabla 3).

30 Adicionalmente, la presente invención abarca células transgénicas que incluyen, pero no se limitan a semillas, organismos y plantas en las cuales se han introducido los genes que codifican los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de limitantes de plantas receptoras adecuadas para introducir polinucleótidos de la invención, polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención, ADNc que es contenido en un depósito y/o fragmentos de variantes de los mismos, aparecen en lista en la tabla tres a continuación:

**TABLA 3**

Nombre Común	Familia	Nombre en Latín
Maiz	Gramineae	Zea mays
Maiz, Dent	Gramineae	Zea mays dentiformis
Maiz, briznas	Gramineae	Zea mays vulgaris
Maiz, Palomitas	Gramineae	Zea mays microsperma
Maiz, Suave	Gramineae	Zea mays amylacea
Maiz, Dulce	Gramineae	Zea mays amyleasaccharata
Maiz, Dulce	Gramineae	Zea mays saccharate
Maiz, Ceroso	Gramineae	Zea mays ceratina
Trigo, Dinkel	Poideae	Triticum spelta
Trigo, Drum	Poideae	Triticum durum
Trigo, Inglés	Poideae	Triticum turgidum
Trigo, espelta Largo	Poideae	Triticum spelta
Trigo, Pulimentado	Poideae	Triticum polonium
Trigo, Poulard	Poideae	Triticum turgidum
Trigo, De Grano Simple	Poideae	Triticum monococcum
Trigo, espelta Pequeño	Poideae	Triticum monococcum

Trigo, Suave	Poideae	Triticum aestivum
Arroz	Gramineae	Oryza sativa
Arroz, Silvestre Americano	Gramineae	Zizania aquatica
Arroz, Australiano	Gramineae	Oryza australiensis
Arroz, Indio	Gramineae	Zizania aquatica
Arroz, Rojo	Gramineae	Oryza glaberrima
Arroz, Tuscarora	Gramineae	Zizania aquatica
Arroz, de África Occidental	Gramineae	Oryza glaberrima
Cebada	Poideae	Hordeum vulgare
Cebada, Abisinia Intermedia, también Irregular	Poideae	Hordeum irregulare
Cebada, Tworow Ancestral	Poideae	Hordeum spontaneum
Cebada, sin barbas	Poideae	Hordeum trifurcatum
Barley, Egipto	Poideae	Hordeum trifurcatum
Barley, cuatro hileras	Poideae	Hordeum polystichon
Barley, seis hileras	Poideae	Hordeum vulgare hexastichon
Barley, de dos hileras	Poideae	Hordeum distichon
Algodon, Abroma	Dicotyledoneae	Abroma augusta
Algodón, Tierras Altas Americanas	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Algodón, Árbol Asiático, también Árbol Indio	Malvaceae	Gossypium arboreum
Algodón, Brasileño, también, Kidney y Pernambuco	Malvaceae	Gossypium barbadense brasiliense
Algodón, Levante	Malvaceae	Gossypium herbaceum
Algodón, hebra Larga, también Fibra Larga, Sea Island	Malvaceae	Gossypium barbadense
Algodón, Mexicano, también Hebra Corta	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Soja, Soya	Leguminosae	Glycine max
Remolacha de azúcar	Chenopodiaceae	Beta vulgaris altissima
Caña de azúcar	Woody-plant	Arenga pinnata
Tomate	Solanaceae	Lycopersicon esculentum
Tomate cherry	Solanaceae	Lycopersicon esculentum cerasiforme
Tomate común	Solanaceae	Lycopersicon esculentum
Tomate corriente	Solanaceae	Lycopersicon pimpinellifolium

Tomate Husk	Solanaceae	Physalis ixocarpa
Tomate Hyenas	Solanaceae	Solanum incanum
Tomate Pera	Solanaceae	Lycopersicon esculentum pyriforme
Tomate Árbol	Solanaceae	Cyphomandra betacea
Patata	Solanaceae	Solanum tuberosum
Patata, Española, Patata dulce	Convolvulaceae	Ipomoea batatas
Senteno, Común	Pooideae	Secale cereale
Senteno, Montaña	Pooideae	Secale montanum
Pimiento, Campana	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pimiento, Pájaro, también Cayena, Guinea	Solanaceae	Capsicum annuum minimum
Pimiento, Bonnet	Solanaceae	Capsicum sinense
Pimiento, Nariz de toro, también dulce	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pimiento, Cherry	Solanaceae	Capsicum annuum cerasiforme
Pimiento, Cluster, también Red Cluster	Solanaceae	Capsicum annuum fasciculatum
Pimiento, Cono	Solanaceae	Capsicum annuum conoides
Pimiento, Cabra, también Spur	Solanaceae	Capsicum frutescens
Pimiento, Largo	Solanaceae	Capsicum frutescens longum
Pimiento, Rojo Ornamental, también Arrugado	Solanaceae	Capsicum annuum abbreviatum
Pimiento, Rojo Tabasco	Solanaceae	Capsicum annuum conoides
Lechuga, Jardín	Compositae	Lactuca sativa
Lechuga, Espárragos, también Apio	Compositae	Lactuca sativa asparagina
Lechuga, Azul	Compositae	Lactuca perennis
Lechuga, Azul, también Achicoria	Compositae	Lactuca pulchella
Lechuga, Repollo, también Cabeza	Compositae	Lactuca sativa capitata
Lechuga, Cos, también Hoja Larga, Romana	Compositae	Lactuca sativa longifolia
Lechuga, crespa, también Rizada, de esqueje, Hoja	Compositae	Lactuca sativa crispa
Apio	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Apio, Blanqueante, también Jardín	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Apio, Raíz, también de raíz de nabo	Umbelliferae	Apium, graveolens rapaceum

ES 2 361 925 T3

Berengena, Jardín	Solanaceae	Solanum melongena
Sorgo	Sorghum	All crops species
Alfalfa	Leguminosae	Medicago sativum
Zanahoria	Umbelliferae	Daucus carota sativa
Judías, Trepadora	Leguminosae	Phaseolus vulgaris vulgaris
Judías, Brotes	Leguminosae	Phaseolus aureus
Judías, Brasileña Ancha	Leguminosae	Canavalia ensiformis
Judías, Ancha	Leguminosae	Vicia faba
Judías, Común, también Francesa, Blanca, Riñón	Leguminosae	Phaseolus vulgaris
Judía, Egipto	Leguminosae	Dolichos lablab
Judía, Larga también Yardlong	Leguminosae	Vigna sesquipedalis
Judía, con Alas	Leguminosae	Psophocarpus tetragonolobus
Avena, también Común, Lateral, Árbol	Avena	Sativa
Avena, Negra, también erizada, retorcida	Avena	Strigosa
Avena, erizada	Avena	
Guisantes, también Jardín, Verde, comercial	Leguminosae	Pisum, sativum sativum
Guisante, de Punto negro	Leguminosae	Vigna sinensis
Guisante, de Vaina comestible	Leguminosae	Pisum sativum axiphium
Guisante, Gris	Leguminosae	Pisum sativum speciosum
Guisante, alado	Leguminosae	Tetragonolobus purpureus
Guisante, con arrugas	Leguminosae	Pisum sativum medullare
Girasol	Compositae	Helianthus annuus
Calabaza, Otoño, Invierno	Dicotyledoneae	Cucurbita máxima
Calabaza, Arbusto, también Verano	Dicotyledoneae	Cucurbita pepo melopepo
Clabaza, Turbán	Dicotyledoneae	Cucurbita maxima turbaniformis
Cocombro	Dicotyledoneae	Cucumis sativus
Cocombro, Africano, también Amargo		Momordica charantia

Cocombro, , también Silvestre		Ecballium elaterium
Cocombro, Silvestre		Cucumis anguria
Álamo, Caifornia	Woody-Plant	Populus trichocarpa
Polar, Europeo Negro		Populus nigra
Álamo, Gris		Populous canescens
Álamo, Lombardía		Populus itálica
Álamo, Hoja de plata, también Blanco		Populus alba
Álamo, Bálsamo Occidental		Populus trichocarpa
Tabaco	Solanaceae	Nicotiana
Arabidopsis Taliana	Cruciferae	Arabidopsis thaliana
Césped	Lolium	
Césped	Agrostis	
	Otras familias de Césped	
Trébol	Leguminosae	

#### Actividades Biológicas.

- 5 Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse en ensayos para probar una o más actividades biológicas.

#### Enfermedades Infecciosas

- 10 Los agentes infecciosos pueden inhibir la capacidad global de las plantas para mantener la homeostasis de las plantas y/o homeostasis. Por ejemplo, el agente infección puede inhibir la capacidad de las plantas para controlar la división, diferenciación y desarrollo celular, absorción de agua y minerales del suelo y la translocación de estas sustancias a través de la planta, la fotosíntesis en la translocación de los productos fotosintéticos a áreas de uso o almacenamiento; metabolismo de compuestos sintetizados; reproducción; y almacenamiento de alimento por parte de la planta por marchitación o reproducción, por ejemplo.
- 15 Las células y tejidos afectados de las plantas enfermas se debilitan o se destruyen usualmente por agentes que causan la enfermedad; la capacidad de tales células y tejidos afectados para llevar a cabo las funciones fisiológicas normales se reduce así o se inhibe completamente, causando la muerte de la célula o planta.
- 20 El tipo de tejido afectado determina la función fisiológica afectada. Por ejemplo, la infección de la raíz (por ejemplo, pudrimiento de la raíz), interfiere con la absorción de agua y nutrientes del suelo; la infección de los vasos del xilema (por ejemplo, pozos vasculares, úlceras, etc.) interfiere con la translocación de agua y minerales a la corona de la planta; la infección del follaje (por ejemplo, manchas en hojas, ampollas, mosaicos, etc.); La infección del cortex (por ejemplo úlcera cortical, infecciones virales y micoplasmáticas del floema, etc.) interfiere con la translocación hacia abajo de los productos fotosintéticos; las infecciones en las flores (por ejemplo, ampollas bacterianas o fúngicas, infecciones virales, micoplasmáticas y fúngicas de las flores, etc.) interfiere con la reproducción; las infecciones de los frutos (por ejemplo, pudrimiento de frutos, etc.) interfiere con la reproducción o almacenamiento de alimentos de reservas de alimentos para la nueva planta. La lista anterior de rutas y/o síntomas infecciosos va solamente a título de ejemplo y no debe considerarse como limitante de la presente divulgación. Rutas infecciosas adicionales son
- 25

conocidas en la técnica, algunas de las cuales se describen aquí (véase por ejemplo, Agrios, G. N., in "Plant Pathology", 3rd Ed., Academic Press, Inc., (1988).

5 Los virus son ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o rutas que puedan ser detectadas como prevenidas y/o sometidas a resistencia por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación. Ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a los siguientes virus de ADN y ARN y a sus familias virales: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Dengue, EBV, HIV, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis), Herpesviridae (such as, Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (e. g., Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (e. g., Influenza A, Influenza B, and parainfluenza), Papiloma virus, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Viruelaviridae (such as Smallviruela or Vaccinia), Reoviridae (e. g., Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), and Togaviridae (e. g., Rubivirus). Ejemplos adicionales de virus, incluyen, pero no se limita a los siguientes grupo de Tobamovirus (e. g., Tobacco Mosaic), Tobravirus considerado como grupo (e. g., virus cacostrael del tabaco), Hordeivirus considerado como grupo (e. g., Barlet de banda mosaica), Potexvirus considerado como grupo (e. g., virus X de patata), Carlavirus considerado como grupo (e. g., virus latente del clavel), Potyvirus considerado como grupo (e. g., virus Y de patata), Closterovirus considerado como grupo (e. g., virus amarillo de la remolacha), virus enano del maíz clorótico, virus de la necrosis del tabaco, Tymovirus considerado como grupo (e. g., virus mosaico amarillo del nabo), Tombusvirus considerado como grupo (e. g., virus del tomate leñoso atrofiado), Sobemovirus considerado como grupo (e. g., virus mosaico de la judía sureña), Luteovirus considerado como grupo (e. g., virus enano amarillo de la cebada), Comovirus considerado como grupo (e. g., virus mosaico del guisante), Nepovirus considerado como grupo (e. g., virus de mancha anular del tabaco), virus mosaico del guisante enano, Dianthovirus considerado como grupo (e. g., virus de mancha anular del clavel), Cucumovirus considerado como grupo (e. g., virus mosaico del cocombro), Bromovirus considerado como grupo (e. g., virus mosaico de la bromo), Ilavirus considerado como grupo (e. g., virus veteado del tabaco), virus mosaico de la alfalfa, virus de machas de marchitamiento del tomate, Rhabdoviridae (e. g., virus amarillo necrótico de la lechuga), Rioviridae (e. g., virus de herida tumoral), Geminivirus considerado como grupo (e. g., virus veteado del maíz), and Caulimovirus (e. g., virus mosaico de la coliflor). Virus adicionales capaces de infectar una planta o un animal conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, y Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia,(1972).

10 Los virus que caen dentro de estas familias pueden causar una gran variedad de enfermedades o síntomas, generalmente incluyendo, pero no limitándose a: mosaicos, manchas anulares, atrofiamiento, enanismo, enrollamiento de hojas, amarillamiento, veteado, viruela, enanismo, tumores, picaduras del tallo, aspermia, esterilidad, picaduras de la fruta, aplanamiento y distorsión del tallo; y específicamente incluyen, pero no se limitan al mosaico del tabaco, mosaico de las judías, mosaico de la manzana, mosaico de la pera de patrón anular, mosaico enano del maíz, ruptura de tulipán, mancha anular del tabaco, mancha anular necrótica de la ciruela, mancha anular del olmo, mancha anular del crisantemo, mancha anular de la lila, mancha anular del arandano, amarillamiento de remolocha, mosaico veteado del trigo, grabado del tabaco, enación de la avena, aclaramiento de vena, bandeado de la vena, necrosis de la vena, enrollamiento de la hoja de patata, ruptura de la hoja de la uva, deshilachamiento del tomate, marchitamiento, punta amontonada del banano, citrus tristeza, brote hinchado de cacao, perforación del tallo, limbo plano de la manzana, corteza rugosa de la pera, necrosis del tallo, línea marron de injerto, fluido negro de úlceras de cereza, fluido de úlceras zonales del olmo, vesícula lenosa de cítricos, tumor con lesión del clavo, anillo rojizo de la manzana, piel cicatrizada de la manzana, perforación pedrosa de la pera, marchitamiento manchado, etc. Los virus también pueden llevar a una fotosíntesis disminuida, clorofila disminuida por hoja, fotosíntesis disminuida, clorofila disminuida por hoja, eficiencia disminuida de la clorofila, descenso en la producción de hormonas vegetales, descenso en la rata de crecimiento, descenso en el nitrógeno soluble, descenso en los niveles de carbohidratos, incluso un incremento o descenso en la respiración, metabolismo agarrante de la planta, translocación disminuida de agua, retención disminuida nutrientes, transpiración incrementada, rendimientos reducidos, transcripción modulada de la planta, traducción modulada de la planta, y metabolismo celular aberrante. Síntomas adicionales causados por las infecciones virales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra; Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972); y en "Viral and Rickettsial Infections of Animals", eds, Betts, A. O., and York, C. J., Academic Press, NY, (1967)). Los polinucleótidos o polipéptidos, o agonistas o antagonistas de la divulgación pueden utilizarse bien sea para detectar, prevenir y/o conferir directa o indirectamente resistencia a uno cualquiera de estas rutas o enfermedades. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de la presente invención puede inhibir directamente un trastorno o infección cuando se expresa transgénicamente en una planta. Alternativamente, el ejemplo de un polinucleótido o polipéptido de la presente invención puede inhibir directamente un trastorno o infección inhibiendo la capacidad del virus para transmitir la infección de una planta a otra.

15 Como se infiere más arriba, las infecciones virales trasplantes pueden ser transmitidas a través de un cierto número mecanismos, que incluyen, pero no se limitan a los siguientes: transmisión a través de propagación vegetativa, transmisión mecánica a través de excavación, transmisión por semillas, transmisión por polen, transmisión por insectos, transmisión por pulgas, transmisión por nematodos, transmisión fúngica y transmisión por anulación. Los polinucleótidos o polipéptidos, o agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden ser utilizados para detectar, prevenir, inhibir y/o conferir, directa o indirectamente, resistencia a cualquiera de los mecanismos de transmisión viral.

- De la misma forma como los agentes bacterianos que pueden causar enfermedades o síntomas en las plantas o animales pueden detectarse, prevenirse y/o recibir resistencia en la planta por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación. Ejemplos de tales agentes bacterianos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y familias bacterianas y hongos: Bacillaceae (e. g., Anthrax, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (e. g., Borrelia burgdorferi), Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatocycoses, E. coli (e. g., Enterotoxigenic E. coli and Enterohemorrhagic E. coli), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (e. g., Salmonella typhi, and Salmonella paratyphi), Serratia, Yersinia), Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospirosis, Listeria, Mycoplasmatales, Mycobacterium leprae, Vibrio cholerae, Neisseriaceae (e. g., Acinetobacter, Gonorrhea, Meningococcal), Meissería meningitidis, Pasteurellacea Infections (e. g., Actinobacillus, Haemophilus (e. g., Haemophilus influenza type B), Pasteurella), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Syphilis, Shigella spp., Staphylococcal, Meningococcal, Pneumococcal y Streptococcal (e. g., Streptococcus pneumoniae y Grupo B Streptococcus). Ejemplos adicionales de agentes bacterianos incluyen, por ejemplo,, Agrobacterium, Clavibacter, Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Streptomyces, Xylella, Mycoplasma, Achleoplasma, y Spiroplasma. Agentes bacterianos adiciones capaces de detectar una planta o animal son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, and Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972)). Agentes bacterianos que caen dentro de cualquiera de las familias antes mencionadas pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, generalmente incluyendo, pero no limitándose a: manchas en hojas, ampollas en hojas, putrefacción suave (por ejemplo, de frutas, raíces, órganos de almacenamiento, etc.), marchitamientos, sobrecrecimiento, costras, fluido de úlcera, nódulos, vesículas, amarillamiento, necrosis del floema, enfermedad X, fasciación, y raíces vellosas; y específicamente, por ejemplo, vesícula de corona, vesícula en ramas, vesícula de caña, putrefacción anular de patata, fluido de úlceras de tomate y marchitamiento, marchitamiento de yema de banano, putrefacción de esqueje, venación negra, putrefacción en bulbo, fluido de úlceras de cítricos, ampollas en nueces, costra de pata, putrefacción en suelo de patata dulce, fuego silvestre de tabaco, ampolla en judías, mancha angular en hoja de cocombro, mancha angular en hoja de algodón, ampolla en cereal, ampolla en césped, mancha bacteriana en tomate, mancha bacteriana en pimiento, mancha bacteriana en fruta piedra, marchitamientos bacterianos vasculares, marchitamientos bacterianos en cucúrbitas, ampollas en pera, ampollas en manzana, putrefacción anular en patata, marchitamientos bacterianos del sur de las plantas solanáceas, enfermedad de moko de la banana, gumosis en los arboles de fruta de piedra, enfermedad de Pierce de la uva, agostamiento de la hoja de almendra, alfalfa enana, pera falsa, escaldado de la hoja de ciruela, marchitamiento de soca, hoja retorcida de trébol, estrella amarilla, yemas grandes, proliferación en manzana, amarillamiento en peras, apple rubbery Wood, declinamiento en peras, necrosis del floema del olmo, amarillamiento letal del coco, gomosis leñosa de la manzana, fotosíntesis disminuida, clorofila disminuida por hoja, eficiencia de clorofila disminuida por hoja, descenso en la producción hormonal en plantas, tasa de crecimiento disminuida, nitrógeno soluble disminuido, niveles de carbohidratos disminuidos, bien sea en incremento o decremento en la respiración, metabolismo aberrante de las plantas, descenso en la translocación de agua, descenso en la retención de nutrientes, transpiración incrementada, rendimientos reducidos, transcripción modulada de la planta, traducción modulada de la planta, metabolismo celular aberrante y marchitamiento. Síntomas y enfermedades adicionales causadas por los agentes bacterianos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, and Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972)). Los polinucleótidos o polipéptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden utilizarse, bien sea directa o indirectamente, detectar, prevenir y/o conferir resistencia a cualquiera de estos síntomas o enfermedades.
- De la misma forma, los agentes fúngicos que pueden causar enfermedades o síntomas en las plantas o animales pueden detectarse, prevenirse y/o ser objeto de resistencia en la planta por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista de la presente invención.
- Ejemplos de tales agentes fúngicos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: Actinomycetales (e. g., Corynebacterium, Mycobacterium, Norcardia), Cryptococcus neoformans, Aspergillosis, Myxomycota (e. g., Myxomycetes (Fuligo, Muciliago, Physarum, Physarales, etc), and Plasmodiophoromycetes (Plasmodiophora (e. g., P. brassicae), Polymyxa (e. g., P. graminis, etc.), Spongospora (e. g., S. subteranea, etc.)), Eumycota (e. g., Mastigomycotina, Chytridiomycetes (e. g., Olpidium brassicae, Physoderma maydia, Synchytrium endobioticum, Urophlyctis alfae, etc.), Oomycetes, Saprolegniales (e. g., Aphanomyces, etc.), Peronosporales, Pythiaceae, Pythium (e. g., Phytophthora infestans, etc.), Albuginaceae (e. g., Albugo candida, etc.), Peronosporaceae (e. g., Plasmopara viticola, Peronospora nicotianae, Bremia lactucae, Sclerospora graminicola, and Pseudoperonospora cubensis, etc.), Zygomycotina, Zygomycetes, Mucorales, Rhizopus (e. g., Choanephora cucurbitarum, etc.), Endogonales, Endogone, Ascomycotina, Hemiascomycetes, Endomycetales (e. g., Saccharomyces cerevisiae, etc.), Taphrina, Pytenomycetes, Erysiphales (e. g., Erysiphe, Microsphaera, Podosphaera leucotricha, Spaerotheca pannosa, Uncinula necator etc.), Sphaeriales (e. g., Botryosphaeria obtusa, Ceratocystis, Diaporthe, Endothia parasitica, Eutypa armeniacae, Glomerella cingulata, Gnomonia, Hyviruelaylon mammatum, Rosellinia, Valsa, Xylaria, etc.), Hypocreales (e. g., Claviceps purpurea, Gibberella, Nectria, etc.), Loculoascomycetes, Myriangiales (e. g., Elsinoe, etc.), Dothideales (e. g., Capnodium, Didymella, Guignardia bidwellii, Microcyclus elei, Plowrightia morbosum, etc.) Pleosporales (e. g., Cochliobolus sativus, Gaeumannomyces graminis, Pyrenophora, Venturia inaequalis, etc.), Discomycetes, Phacidiales (e. g., Rhytisma acerinum), Helotiales (e. g., Diplocarpos rosae, Higginsia hiemalis, Lophodermium, Monilinia fructicola, Pseudopeziza trifolii, Sclerotinia sclerotiorum, etc.),

- 5 Deuteromycotina, Coelomycetes, Sphaeropsidales (e. g., *Ascochyta pisi*, *Coniothyrium*, *Cytospora*, *Diplodia maydis*, *Phoma lingam*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Septoria apii*, etc.), Melanconiales (e. g., *Celletotrichum*, *Coryneium beijerinckii*, *Cylindrosporium*, *Gloeosporium*, *Marssonina*, *Melanconium fuligenum*, *Sphaceloma*, etc.), Hyphomycetes, Hyphales (e. g., *Alternaria*, *Asperigillus*, *Bipolaris*, *dreschlera*, *Excerophilum*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora*, *Fulvia fulva*, *Fusarium*, *Geotrichum candidum*, *Graphium ulmi*, *Penicium*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Pyricularia*, *Spilocaea*, *Theilaviopsis basicola*, *Trichoderma*, *Verticillium*, etc.), Agonomycetes, Agonomycetales (e. g., *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, etc.), Basidiomycotina, Hemibasidiomycetes, Ustilaginales (e. g., *Sphacelthea*, *Tilletia*, *Urocystis cepulae*, *Ustilago*, etc.), Uredinales (e. g., *Cronartium*, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, *Melampsora lini*, *Phragmidium*, *Puccinia*, *Uromyces appendiculatus*, etc.), Hymenomycetes, Exobasidiales (e. g., *Exobasidium*, etc.), Aphyllchorales (e. g., *Aethalia*, *Corticium*, *Heterobasidium*, *Lenzites*, *Peniophora*, *Polyporus*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Stereum*, etc.), Tulasnellales (e. g., *Thanatephorus*, *Typhula*, etc.), Agaricales (e. g., *Armillaria mellea*, *Marasmius*, *Pholiota*, *Pleurotus*, etc.), and particularly Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Oomycota, Plasmodiophoromycota, *Puccinia recondita*, *Rhizo puschinensis*, *Plasmo paraviticola*, *Plasmodiophora brassicae*, *Erwinia amylovora*, *Elsinoe fawcettii*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Mycosphaerella arachidis*, *Mycosphaerella berkeleyi*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Pyrenophora teres*, *Pyremophora tritici-repentis*, *Venturia carpophila*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria kikuchiana*, *Alternaria mali*, *Alternaria solani*, *Cercospora beticola*, *Cladosporium cucumerinum*, *Septoria lycopersici*, *Blumaria graminis*, *Erysiphe cichoracearum*, *Podosphaera leucotricha*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Uncinula necator*, *Emericella nidulans*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Gibberella fujikuroi*, *Nectria haematococca*, *Fusarium cuhnorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Gliocladium virens*, *Botryotinia fuckeliana*, *Monilinia fructigena*, *Sclerotinia homoeocarpa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mollisia yellundae*, *Glomerella lagenaria*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Gaemannomyces graminis*, *Magneporthe grisea*, *Monographella nivalis*, *Rhynchosporium secalis*, *Athelia rolfsii*, *Typhula incarnata*, *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizoctonia solani*, *Hemileia vastatrix*, *Puccinia hordei*, y *Uromyces appendiculatus*.
- 25 Agentes fúngicos adicionales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, G. C. Ainsworth, in "Fungal Diseases of Animals", Commonwealth Agricultural Bureaux, Farmham Royal Bucks, England, (1959), and Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972)).
- 30 Los agentes fúngicos que caen dentro de cualquiera de la divisiones, subdivisiones, clases, ordenes, generos o especies antes mencionados pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo generalmente, pero no limitándose a: necrosis muerte de la planta, muerte de la célula, hipotrofia, hipoplasia, marchitamiento, hiperplasia (por ejemplo, enrollamiento de raíces, vesículas, verrugas, escoba de brujas, entorchamiento de hojas, etc.), tumores, manchas en hojas, ampollas, fluido de úlceras, muerte regresiva, putrefacción de raíces, daño por humedecimiento, putrefacción del tallo basal, putrefacción blanda, putrefacción seca, antracnosis, costra, declinación, marchitamiento, orín, moho, y tizne; y específicamente, fructificaciones, costra polvosa de la patata, raíz enrollada de crucíferas, maleza negra de la patata, verruga corona de la alfalfa, mancha marrón del maíz, putrefacción de semillas en almácigo, daño por humedecimiento, putrefacción de raíz y tallo, añublo, putrefacción de tubérculos, orín blanco, mohos de lado superior e inferior, oosporas sobre semillas de soja, putrefacción blanda por rhizopus, orín de fruta por rhizopus, putrefacción de calabaza por choanephora, moho del pan, moho de las yemas, putrefacción del tallo, putrefacción de la corona, putrefacción del tronco, enfermedad de vaina roja, añublo tardío de las patatas, enfermedades por Antracnosis, enfermedades por Colletotrichum, manchones de la cebolla, cornezuelo, enfermedades por Botrytis, marchitamientos vasculares, enfermedad del olmo holandés, enfermedades de Gibberella, enfermedades de Sclerotinia, enfermedades de Rhizoctonia, enfermedades de Sclerotium, decaimiento postcosecha de frutas y vegetales, fotosíntesis disminuida, clorofila disminuida por hoja, eficiencia de clorofila disminuida, descenso en la producción hormonal de plantas, descenso en al rata de crecimiento, descenso en nitrógeno soluble, descenso en los niveles de carbohidratos, bien sea un incremento o decremento en la respiración, metabolismo aberrante de las plantas, descenso en la translocación del agua, descenso en la retención de nutrientes, transpiración incrementada, rendimientos reducidos, transcripción modulada de la planta, traducción modulada de la planta, y metabolismo celular aberrante; y particularmente costra en cítricos, putrefacción negra de la uva, mancha del trigo septoria nodorum, mancha temprana de la hoja del cacahuete, sigatoka negra del banano, mancha del trigo septoria tritici, mancha de la cebada, mancha cobriza de los cereales, costra en manzanas, putrefacción en melocotones, mancha negra del repollo, manchas de las hojas de manzana, añublo temprano de tomate y patata, macha de hoja de cercospora, costra de cocombro, mancha de hoja seporial de tomate, moho polvoso del trigo, moho polvoso de la cebada, moho polvoso del cocombre, moho polvoso de la uva, saporfitas, moho verde los cítricos, moho azul de los cítricos, bakanae del arroz, costra de cabeza de los cereales, marchitamiento de cocombro por fusarium, marchitamiento de tomate por fusarium, fusarium amarillo del rábano, humedecimiento del arroz, añublo de la pimienta por botrytis, añublos de la uva, añublos por botrytis del áurea, mancha marrón de drupa, mancha marrón del césped dólar, mancha de ojo de trigo, antracnosis del cocombro, manchas en hojas pestalotiales, explosión en arroz, moho nevado del césped, escaldado de la cebada, añublo por typhula, humectación de rhizoctonia, orín del café, orín de hoja de trigo, orín de hoja de la cebada, y orín de las judías. Los polinucleótidos o polipéptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden usarse, bien directa o indirectamente, para detector, prevenir y/o conferir Resistencia a cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En la técnica se conocen agents fúngicos adicionales capaces de infectar una planta o animal (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, G. C. Ainsworth, in "Fungal Diseases of Animals", Commonwealth Agricultural Bureaux, Farmham Royal Bucks, England, (1959), y Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972)).
- 65

Adicionalmente, los agentes parasiticos que producen enfermedades o sintomas que puedan ser detectados, prevenidos y/o sometidos a resistencia por un polinucleótido o polipeptido y/o agonista o antagonista de la presente divulgacion incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias o clase: Amebiasis, Babesiosis, Coccidiosis, Cryptosporidiosis, Dientamoebiasis, Dourine, Ectoparasitic, Giardiasis, Helminthiasis, Leishmaniasis, Theileriasis, Toxoplasmosis, Trypanosomiasis, y Trichomonas y Sporozoans (e. g., Plasmodium virax, Plasmodium falciparium, Plasmodium malariae, y Plasmodium ovale). Ejemplos adicionales de agentes parasíticos incluyen, por ejemplo, Cuscutaceae (e. g., Cuscuta, dodder, etc.), Vis- caceae (e. g., Arceuthobium (muérdago enano de las coníferas), Phoradendron (muérdago americano verdadero de los árboles de hoja ancha ), y Viscum (muérdago verdadero europeo)), Orobanchaceae (e. g., Orobanche (escobilla del tabaco)), y Scrophulariaceae (e. g., Striga (maleza de bruja de las plantas monocotiledóneas)). Estos parásitos pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, que incluyen, pero no se limitan a: almacenamietno disminuido de agua, disponibilidad disminuida de minerales, almacenamietno disminuido de carbohidratos, defensa disminuida de la planta, e susceptibilidad incrementada a infecciones fúngicas, bacterianas o virales. Enfermedades parasíticas adicionales son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, G. N., Agrios, supra, and Jones, T. C., in "Veterinary Pathology", 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, (1972)). Los polinucleotidos o polipeptidos o agonistas y antagonistas de la divulgación pueden ser utilizados para detectar, prevenir y/o conferir resistencia a cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

Los métodos de tratamiento o prevención que utilizan un polipeptido o polinucleotido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación son bien conocidos en la técnica, aunque pueden incluir la administración de una cantidad efectiva de un polipeptido a la planta, semilla, tejido o células. Alternativamente, la prevención podría ser conferida transformando la planta, semilla, tejido o células con un polinucleotido de la presente invención, o podrían retirarse células de la planta, ser transformadas y luego regresar las células manipuladas a la planta (terapia ex vivo).

Adicionalmente, el polipeptido o polinucleotido de la presente invención puede utilizarse como una antígeno para crear anticuerpos que inhiban la patogenicidad de una enfermedad infecciosa particular (por ejemplo, inhibiendo la expresión de un gen específico para la planta o una proteína crítica para la patogenicidad de un organismo infeccioso). Además, cualquier método para detectar, prevenir, conferir resistencia a, o inhibir un agente infeccioso utilizando un polipeptido o un polinucleotido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación puede aplicarse para detectar, prevenir, conferir resistencia a, o inhibir un agente infeccioso en un humano, animal, mamífero u otro organismo, con o sin modificación adicional.

#### Tolerancia a Plagas

Los nematodos son un ejemplo de plagas capaces de causar enfermedades o deterioros que pueden ser detectados, prevenidos y/o sometidos a resistencia por un polinucleotido o polipeptido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación. Ejemplos de nematodos incluyen, pero no se limitan, a los siguientes: Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidia, Tylenchidea, Tylenchidae, Anguina, Ditylenchus, Tylenchorhynchidae, Tylenchorhynchus, Pratylenchidae, Pratylenchus, Radopho- lus, Hoplolaimidae, Hoplolaimus, Rotylenchus, Helicotylenchus, Belonolaimidae, Belonolaimus, Heteroderoidea, Heteroderidae, Globodera, Heterodera, Meloidogyne, Nacobbidae, Nacobbus, Rotylenchulus, Criconematoidea, Cricone- matidae, Criconemella, Hemicyclophora, Paratylenchidae, Paratylenchus, Tylenchuidae, Tylenchulus, Aphelenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae, Aphlenenchoides, Bursaphelenchus, Rhadinaphelenchus, Dorylaimida, Longidoridae, Longidorus, Xiphinema, Trichodoridae, Paratrichodorus, y Trichodorus. Otros miembros del filum, ordenes, subórdenes, superfamilias, familias, géneros y especies de nematodos son conocidos en la técnica.

Los nematodos que caen en cualquier de los antes mencionados ordenes, subórdenes, superfamilias, familias, generos y/o especies pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas en plantas, incluyendo en general, pero no limitándose a, nudos radiculares, vesículas de raíz, crecimiento reducido de planta, deficiencias en nutrientes en la planta, amarillamiento, marchitamiento, rendimientos reducidos, pobre calidad del producto, vesículas en la planta, lesiones necróticas, putrefacción, retorcimiento o distorsión de hojas y tallos, desarrollo floral anormal; hipertrofia, hipotrofia, quistes y clorosis. Los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden utilizarse, bien sea directa o indirectamente, para detectar, prevenir y/o conferir resistencia a cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Enfermedades y/o trastornos adicionales causados por nematodos son cocidos en la técnica.

Los insectos son otro ejemplo de plagas capaces de causar enfermedades o deterioros que pueden ser detectados, prevenidos y/o sometidos a resistencia por un polinucleotido o péptido y/o agonista o antagonista de la presente divulgación. Ejemplos de insectos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Ano- plura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera.

Los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden utilizarse, bien sea directa o indirectamente, para detectar, prevenir y/o conferir resistencia a cualquier de los siguientes síntomas o enfermedades, no limitantes, causados por plagas de insectos de cultivos principales: Maíz: Ostrinia nubilalis, perforador europeo del maíz.; Agrotis ipsilon, gusano negro del corazón; Helicoverpa zea, gusano del maíz ; Spodoptera ftugiperda, gusano soldado del otoño ; Diatraea grandiosella, taladro del maíz del suroeste; Elasmopalpus lignosellus, taladro del tallo de maíz menor; Diatraea saccharalis, taladro de la caña de azúcar;

Diabrotica virgifera, gusano de la raíz del maíz occidental ; Diabrotica barberi, gusano de la raíz del maíz nortero ; Diabrotica undecimpunctata howardi, escarabajo manchado del cocombro, Melanotus spp., gusanos de alambre ; Cyclocephala borealis, gusanos de alambre (larva blanca); Cyclocephala immaculata, escarabajo enmascarado del sur (larva blanca); Popillia japonica, Escarabajo japonés; Chaetocnema pulicaria, escarabajo pulga del maíz; Sphenophorus maidis, picudo del maíz; Rhopalosiphum maidis, áfido de la hoja del maíz; Anuraphis maidiradicis, áfido de la raíz del maíz; Blissus leucopterus,; Melanoplus femurrubrum, saltamontes de patas rojas; Melanoplus sanguinipes, saltamontes migratorio; Delia platura, gusano de la semilla del maíz; Agromyza parvicornis, devorador de hojas del maíz ; Anaphothrips obscurus, invasor del césped; Solenopsis milesta, hormiga ladrona; Tetranychus urticae, ácaro araña de dos manchas ; Busseola Jusca, Taladro del tallo de maíz africano (AMB); Sesamia calamistis, Taladro rosa africano (AP13) ; Eldana sacchharina, Taladro africano de la caña de azúcar (ASB); Chilo partellus, Taladro del tallo del sorgo (SSB); Ostrinia furnacalis, Taladro del maíz oriental (OCB); Sesamia nonagrioides, taladro del maíz de Europa/N. Africa; Syrahum: Cilo partellus, taladro del sorgo; Spodoptera ftugiperda, gusano soldado del otoño ; Reli- coverpa zea, gusano del maíz ; Elasmopalpus lignosellus, taladro del tallo de maíz menor; Agrotis subterranea, gusano cortador granulado; Phyllophaga crinita, larva blanca; Eleodes, Conoderus, y Aeolus spp., gusanos de alambre ; Oulema melanopus, escarabajo de las hojas de los cereales; Chaetocnema pulicaria, escarabajo pulga del maíz; Sphenophorus maidis, picudo del maíz; Rhopalosiphum maidis; áfido de la hoja del maíz; Siphaflava, áfido amarillo de la caña de azúcar; Blissus leucopterus,; Contarinia sorghicola, mosquito del sorgo; Tetranychus cinnabarinus, ácaro araña carmín; Tetranychus urticae, ácaro araña de dos manchas; Schizaphis graminum, Bicho verde (áfido); Wheat: Pseudaletia unipunctata, gusano soldado ; Spodoptera ftugiperda, gusano soldado del otoño ; Elasmopalpus- lignosellus, taladro del tallo de maíz menor; Agrotis orthogonia, gusano rezador occidental; Oulema melanopus, escarabajo de las hojas de los cereales; Hypera punctata, gorgojo de la hoja del trébol; Diabrotica undecimpunctata howardi, escarabajo manchado del cocombro; Áfido ruso del trigo; Schizaphis graminum, bicho verde; Sitobion avenae, Áfido inglés de los granos; Melanoplus femurrubrum, saltamontes de patas rojas; Melanoplus differentialis, saltamontes diferencial; Melanoplus sanguinipes, saltamontes migratorio; Mayetiola destructor, Mosca de Hesse; Sitodiplosis niosellana, mosquito del trigo; Meromyza americana, gusano del tallo del trigo; Hylemya coarctata, mosca del bulbo del trigo; Frankliniella jusca, invasor del tabaco; Cephus cinctus, mosca de sierra del tallo del trigo ; Eriophyes tulipae, ácaro del entorchamiento del trigo; Girasol. Suleima helianthana, polilla del girasol; Homeosoma ellectellum, polilla de cabeza del girasol ; Zygoramma exclamationis, escarabajo del girasol; Bothyrus gibbosus, escarabajo de la zanahoria; Neolasiptera murfeldtiana, ácaro de la semilla del girasol; Cochylis hospes, polilla de bandas del girasol; Rachiplusia nu, enrollador argentino; Smicronyx julvus, gorgojo rojo de la semilla del girasol; Cylindrocopturus adpersus, gorgojo manchado del tallo del girasol; Algodón: Heliothis virescens, gusano dle tabaco ; Helicoverpa zea, gusano del algodón; Spodoptera exigua, gusano soldado de la remolacha ; Pectinophora gossypiella, gusano rosa del algodón; Anthonomus grandis, gorgojo del algodón; Aphis gossypii, áfido del algodón; Pseudatomoscelis seriatus, pulga saltona del algodón ; Trialeurodes abutilonea, mosca blanca de alas con bandas; Lygus lineolaris, insecto ennegrecido de las plantas; Melanoplus femurrubrum, saltamontes de patas rojas; Melanoplus differentialis, saltamontes diferencial; Thrips tabaci, invasores de la cebolla; Franklinkiella jusca, invasor del tabaco; Tetranychus cinnabarinus, ácaro araña carmín; Tetranychus urticae, ácaro araña de dos manchas; Arroz: Diatraea saccharalis, taladro de la caña de azúcar; Spodoptera ftugiperda, gusano soldado del otoño ; Helicoverpa zea, gusano del maíz ; Colaspis brunnea, colaspis de la uva; Lissorhoptrus oryzophilus, gorgojo de agua del arroz; Sitophilus oryzae, gorgojo del arroz; Nephotettix nigropictus, saltahojas del arroz ; Blissus leucopterus,; Acrosternum hilare, insecto fétido maloliente; Pseudoplusia includens, enrollador de la soja; Anticarsia gemmatalis, oruga de terciopelo; Plathypena costrara, gusano verde del trébol ; Ostrinia nubilalis, Taladro de maíz europeo; Agrotis ipsilon, gusano negro del corazón; Spodoptera exigua, gusano soldado de la remolacha ; Heliothis virescens, cotton boll worm ; Helicoverpa zea, gusano del algodón; Epilachna varivestis, Escarabajo mexicano de las judias; Myzus persicae, áfido verde del melocotón; Empoasca jabae, saltahojas de la patata; Acrosternum hilare, insecto fétido maloliente; Melanoplus femurrubrum, saltamontes de patas rojas; Melanoplus differentialis, saltamontes diferencial; Delia platura, gusano de la semilla del maíz; Sericothrips variabilis, invasor de la soja; Thrips tabaci, invasores de la cebolla; Tetranychus turkestani, ácaro araña de la fresa; Tetranychus urticae, ácaro araña de dos manchas; Cebada. Ostrinia nubilalis, Taladro de los cereales europeo; Agrotis ipsilon, gusano negro del corazón; Schizaphis graminum, green- bug; Blissus leucopterus,; Acrosternum hilare, insecto fétido maloliente; Euschistus servus, brown stink bug; Delia platura, gusano de la semilla del maíz; Mayetiola destructor, Mosca de Hess; Petrobia latens, ácaro marrón del trigo; Rgpe de oleaginosaa; Brevicoryne brassicae, cabbage aphid; Flea beetle, Phyllostreta spp.; Bertha Armyworm ; Mamestra configurata; Diamondback Moth; Plutella xylostella; Alfalfa: enrollador de la alfalfa, Autographa californica ; escarabajo morrudo de la alfalfa, Otorhynchus ligusticii; oruga de la alfalfa, Colias eurytheme; medidor manchado de la alfalfa, Agronyza frontella ; Gorgojo egipcio de la alfalfa, hypera brunneipeonis ; babosa de los prados, Philaerius spumarius; áfido manchado de la alfalfa, Theriophis meculata; gorgojo de la hoja del trébol, Hypera punctata; áfido del guisante, Acyrthosiphon pisum; áfido azul de la alfalfa, Acyrthosiphon kondoi; gusano verde del trébol, Plathypena costraia; curculio de la raíz del trébol, Sitona hispidulus; cálcido de la semilla de la alfalfa, Brachophagus roddi; tarnished plantbug, Lygus lineolaris; insecto fétido, Chlorochroa sayi; oruga de terciopelo, Anticarsia ftiegiperda, gorgojo de la alfalfa, Hypera postica; gusano del otoño, Spodoptera; saltahojas de la patata, Empoasca jabae; enrollador de la soja, Psuedolusia incluye; saltador de t res cuernos de la alfalfa, Spissistilus jestinus; etc.. En la técnica se conocen plagas de insectos adicionales. Véase, por ejemplo, Many B. Stoetzel (1989) Common Names of Insects & Related Organisms, Entomological Society of America.

Además, los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación pueden ser útiles en detectar, prevenir y/o conferir resistencia a otras plagas de plantas, incluyendo, pero no limitándose a, insectos, especies herbáceas, hongos, bacterias, virus y otras plagas divulgadas aquí. Por ejemplo, los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación pueden, bien sea directa o indirectamente, modular (preferiblemente hacer disminuir), la biosíntesis, asimilación y/o concentración de un nutriente esencial para la supervivencia de la plaga.

Alternativamente, los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación pueden modular (preferiblemente incrementar) la biosíntesis de un metabolito y/o proteína capaz de hacer disminuir la biosíntesis, asimilación y/o concentración un nutriente esencial para la supervivencia de la plaga. Un ejemplo se relaciona con la observación que las plantas que acogen el gen colesteral oxidasa fueron resistente al gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis grandis* Boheman) larvae (Purcell, JP., *Biochem Biophys Res Commun*, 196 (3): 1406-13 (1993)).

Pues que el colesterol es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos, incluyendo los insectos, los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación capaces de modular los niveles y/o actividad de las enzimas que degradan el colesterol, incluyendo la colesteral oxidasa, serian útiles en conferir resistencia a las plagas de plantas. En otro ejemplo, las plantas que expresan ciertos laterógenos han demostrado conferir resistencia a algunos patógenos. Tales laterógenos han sido identificados como capaces de interferir con la síntesis y/o agregación del colágeno.

Los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación, pueden ser utilizados, bien sea directa o indirectamente, para detectar, prevenir y/o conferir resistencia a cualquiera de las plagas y/o enfermedades divulgadas aquí a través de la aplicación tópica en las plantas cuya protección se desea. Por ejemplo, recientemente se han introducido en el mercado varios pesticidas comerciales basados en proteínas y/o péptidos que proporcionan amplia resistencia a los pesticidas a plagas cuando se aplican directamente en la planta. Messenger, de Eden Bioscience, y Actigard, from Novartis Crop Protection (*Nat. Biotech.*, 18 : 595 (2000)). El Messenger se basa en el gen de la *Erwinia amylovara* (Wei, Z., *Science*, 257: 85-88 (1992)). Tales pesticidas con base en proteínas/péptidos han demostrado activar la ruta de resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas. La divulgación abarca modos adicionales de acción para conferir resistencia a plagas de plantas, a través de la activación directa o indirecta de la ruta SAR por los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonista de la divulgación, lo cual se prefiere. El método de aplicación tópica, que incluye cualquier requerimiento de formulación, variará con base en las características únicas de cada polinucleotido o polipeptido, agonista o antagonista de la divulgación. Además, los polinucleotidos o polipeptidos, agonistas o antagonistas de la divulgación que proporcionan resistencia a los patógenos de las plantas pueden tener también otros usos benéficos, tales como, por ejemplo, potenciamiento del crecimiento de la planta.

#### Defensa de la Planta.

Un polinucleotido o polipeptido de la presente invención puede utilizarse para incrementar los mecanismos de defensa de las plantas contra el estrés ambiental (por ejemplo, lluvia acida, sequía, agresión química, etc.). Tales mecanismos de defensa pueden ser una combinación de características estructurales (esto es, sirven como una barrera física para inhibir un patógeno, por ejemplo, de que entre o se esparza a través de la planta), y reacciones bioquímicas bien sea en la escala de la planta completa o en células individuales (por ejemplo, produciendo sustancias que bien son toxicas para el patógeno, o bien crean un ambiente que es no permisivo para la supervivencia de los patógenos, etc.).

Estructuralmente, un polipeptido o polinucleotido de la presente invención puede ser útil para incrementar el número de tricomas, incrementando el espesor y/o la composición de las secreciones cerosas o la capas cerosa, incrementando el espesor y/o composición de la cuticula, alterando la estructura de la pared celular epidérmica, alterando el tamaño, forma y/o localización de los estomas y lenticelos, induciendo que la planta cree o incremente una capa de células de pared gruesa (por ejemplo, capa de células de corcho, etc.), incrementando el espesor y/o la composición de la pared celular epidérmica exterior, induciendo la formación de una capa de abscisión, induce a la formación de tilosas, induce la producción y/o de producción de gomas, induciendo el engrosamiento de la capa celular del parénquima externo de la pared celular, induciendo el espesor de la pared celular, induciendo la deposición de papilas callosas en la capa interna de la pared celular.

#### Hormonas Vegetales.

##### Hormonas vegetales

Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede utilizarse para modular los niveles de hormonas dentro de la planta (incluyendo los de sus células, tejidos y/o órganos, etc.). Ejemplos de hormonas que pueden modularse por la presente invención, bien sea directa o indirectamente, incluyen en general, pero no se limitan a, los siguientes: auxinas, ácido indolacético, gibelerinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, poliaminas, jasmonatos, ácido tuberónico, ácido salicílico, sistemina, brasinolidas, zeatina; y específicamente, ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico, ácido 4-cloroindol-3-acético, ácido indol-3-acetil-1-O-B-D-glucosa, ácido indol-3-acetil-mio-inositol,

- 5 ácido jasmónico, jasmonato de metil, kinetina, incluyendo cualquier derivado conocido de las hormonas descritas más arriba, etc.. En este contexto, la modulación debe ser aplicada para implicar un incremento, inducción o terminación cualitativa o cuantitativa de los niveles de expresión de cualquiera de las hormonas antes mencionadas. Ejemplos adicionales de hormonas de vegetales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Davies, P. J., in "Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology", Kluwer Academic Publishers, Boston, 1995;).
- 10 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de auxina en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, en una planta: estimular el crecimiento de las células, según el crecimiento del tallo, estimular la división celular en el cambium, estimular la diferenciación del floema y el xilema, estimular la iniciación de los cortes de raíces sobre el tallo, estimular el desarrollo de las raíces ramificadas, estimular la diferenciación de raíces, mediar en la respuesta de flexionamiento (tropística) de los brotes y raíces ante la gravedad de la luz, represión de brotes laterales, retardo de la senescencia de las hojas, inhibición o promoción de abscisión de hojas y frutos (a través de etileno), la inducción de formación y crecimiento de frutas, potenciamiento del transporte asimilado via floema, retardo de la maduración de las frutas, promoción de la floración de las bromelias, estimulación del crecimiento de flores, promoción de feminidad en flores dioecias, y estimulación de la producción de etileno, por ejemplo.
- 20 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de giberelina en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos no limitantes sobre las plantas: estimular la división celular y la elongación celular, introducir la germinación de semillas en ausencia de estratificación o endurecimiento, simular la producción de  $\alpha$ -amilasa, inducir la formación y crecimiento de las frutas, e inducir la desaparición de flores dioecias, por ejemplo.
- 25 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de citoquinina en las plantas, necesariamente serían capaces de los siguientes efectos, no limitantes, sobre una planta: inducir la división celular en presencia de auxina, inducir la división celular en tumores vesícula de corona, inducir la división celular en el meristema, inducir la división celular en células de rápida división, promover la iniciación de brotes, inducir la formación de yemas, inducir el crecimiento de yemas laterales, liberar el crecimiento de yemas laterales del dominio apical, inducir el alargamiento celular, inducir expansión de hojas, potenciar la apertura de los estomas, estimular la acumulación de clorofila, inducir la conversión de etioplastos en cloroplastos, y retardar la senescencia de las hojas, por ejemplo.
- 30 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de etileno la planta, sería necesariamente capaz de los siguientes aspectos, no limitantes, sobre una planta: liberar la planta de la latencia, inducir el crecimiento de brotes y raíces y su diferenciación, inducir la formación de raíces adventicias, inducir la abscisión de hojas y frutos, inducir la floración, inducir la feminidad en flores dioecias, inducir la apertura de las flores, inducir la senescencia de flores y hojas, inducir la maduración de frutos, por ejemplo.
- 35 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de ácido abscísico en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, en una planta: inducir el cierre de los estomas, la inhibición del crecimiento de los brotes, inducir la síntesis de proteínas de almacenamiento en semillas, la inhibición de la producción de  $\alpha$ -amilasa en la germinación de granos cereales, la inducción de algunos aspectos de latencia y la inducción de la síntesis del inhibidor de proteínasa, por ejemplo.
- 40 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de ácido abscísico en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, en una planta: inducir el cierre de los estomas, la inhibición del crecimiento de los brotes, inducir la síntesis de proteínas de almacenamiento en semillas, la inhibición de la producción de  $\alpha$ -amilasa en la germinación de granos cereales, la inducción de algunos aspectos de latencia y la inducción de la síntesis del inhibidor de proteínasa, por ejemplo.
- 45 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de polamina en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes aspectos, no limitantes, sobre una planta: regulación del crecimiento y desarrollo de células y tejidos vegetales, modulación de la síntesis de macromoléculas, modelación de la actividad de macromoléculas, estabilización de la membrana del plasma celular, disminución de la fuga de betacianina de los tejidos lesionados, preservación de la estructura tilacoide en hojas de avena separadas, contrarrestación de los efectos inducidos por hormonas sobre la membrana celular, enlazamiento ácidos nucleicos, protección de los ácidos nucleicos de los agentes alquilantes, control de la condensación de cromosomas, control de la disolución de la membrana nuclear durante la pre-profase y modulación de la estructura y funcionamiento de los ARNt, por ejemplo.
- 50 Polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de jasmonato en las plantas, necesariamente sea capaz sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, sobre una planta: inhibición del crecimiento de la planta, inhibición de la germinación de semillas, promoción de senescencia, promoción de abscisión, promoción de la formación de tubérculos, promoción de la maduración de frutos, promoción de la formación de pigmentos, promoción del enrollamiento de zarcillos, intención de los inhibidores de proteínasa, e inhibición de la infestación por insectos, por ejemplo.
- 55 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de ácido salicílico en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, sobre una planta: inducción de tenogénesis, proveyendo resistencia a patógenos a través de la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, potenciamiento de la longevidad de la flor, inhibición de la biosíntesis de etileno, inhibición de la germinación de semillas, inhibición de la respuesta a lesiones, contrarrestar las respuestas a las plantas al ácido abscísico, por ejemplo.
- 60 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de ácido salicílico en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, sobre una planta: inducción de tenogénesis, proveyendo resistencia a patógenos a través de la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, potenciamiento de la longevidad de la flor, inhibición de la biosíntesis de etileno, inhibición de la germinación de semillas, inhibición de la respuesta a lesiones, contrarrestar las respuestas a las plantas al ácido abscísico, por ejemplo.
- 65

Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de brasinosteroides en las plantas, necesariamente sería capaz de los siguientes efectos, no limitantes, sobre una planta: promoción de la elongación del tallo, inhibición del crecimiento de raíces, inhibición del desarrollo de raíces, promoción de la biosíntesis de etileno, y promoción de la epinastia, por ejemplo.

5 Los polinucleótidos o polipéptidos y/o agonistas o antagonistas pueden modular 1,2,3 o mas, o cualquier combinación de las anteriores hormonas en una planta. Efectos adicionales de las hormonas en una planta, incluyendo sus células, tejidos y órganos son conocidos en la técnica y los efectos de las hormonas en plantas antes mencionados deben entenderse como limitantes de la utilidad de cualquiera de los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención.

#### Regeneración

15 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede utilizarse para diferenciar, proliferar, y/o atraer células, llevando la regeneración de tejidos (véase, Science 276: 59-87 (1997)). La regeneración de tejidos podría ser utilizada para reparar, reemplazar y/o proteger los tejidos dañados por agresiones ambientales (por ejemplo, herbicidas, fotblanqueado, lluvia ácida, sequía, nematodos, insectos, productos químicos, etc.), enfermedades (fúngica, viral, bacteriana, micoplasmica, etc.), necrosis, reacción hipersensible, y/o daño en la citoquina.

20 Los tejidos que podrían ser regenerados utilizando los polinucleótidos o polipéptidos incluyen tejidos (por ejemplo, meristema apical, brote lateral, yema lateral, hojas, médulas, cambium vascular, tallo, floema, axilema, córtex, epidermis, raíz lateral, meristema radicular, cutícula, etc.), además de organelos y constituyentes celulares (vacuola, mitocondria, cloroplasto, plástidos, lisosomas, peroxisomas, glioxisomas, citoplasma, retículo endoplasmático, ribosomas, membrana vacuolar, núcleo, membrana nuclear, plasmodesmata, esquerosomas, microcuerpos, paredes celulares primarias, etc.).

#### Nutrientes

30 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede utilizarse para modular los estatus tradicionales de las plantas través de cierto número diferentes mecanismos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede utilizarse para modular la capacidad de las plantas para retener un nutriente particular, para modular la capacidad de las plantas para sintetizar un nutriente particular, para modular la capacidad de las plantas para asimilar un nutriente, para modular la capacidad de las plantas para absorber o consumir un nutriente particular, para modular la capacidad de las plantas para transportar un nutriente particular, para modular la capacidad de las plantas para almacenar un nutriente particular, para modular la capacidad de las plantas para sobrevivir bajo deficiencias nutricionales, y para prevenir, detectar y/o proveer resistencia a síntomas y deterioros por deficiencia nutricional.

40 Ejemplos específicos de nutrientes que pueden ser modulados en una planta por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista incluyen los siguientes nutrientes, no limitantes: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio, boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, zinc, molibdeno, cobalto, selenio, silicio, sodio, níquel, agua, dióxido de carbono, además de los subproductos metabólicos, etc.. Nutrientes adicionales esenciales para mantener la homeóstasis de las plantas son conocidos en la técnica.

45 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de boro en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de boro en las plantas: necrosis terminal en las hojas, formación de capas de abscisión prematuras en las hojas, acortamiento de los internodos en los brotes terminales, ennegrecimiento y/o muerte del tejido meristemático apical, acortamiento de los brotes de raíces, enanismo en la planta, marchitamiento de la planta, incapacidad del desarrollo floral, incapacidad del desarrollo de semillas, etc.

50 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de calcio en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y conferir resistencia a los siguientes síntomas, no limitantes, de la deficiencia de calcio en las plantas: hojas cloróticas, entorchamiento de hojas, degradación de los tejidos meristemáticos en tallos y raíces, muerte del tejido meristemático, desarrollo disminuido de la raíz, contenido de fibra disminuido en la raíz, desarrollo disminuido de las frutas, etc.

55 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de cloro en las plantas, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de cloro en las plantas: marchitamiento de las puntas de las hojas, clorosis de hojas, bronceado de hojas, necrosis de hojas basipetalicas proximal a las áreas de marchitamiento, etc.

60 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de cobre en la planta puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas, no limitantes, de la deficiencia de cobre en la planta: marchitamiento de los brotes terminales, muerte del brote terminal,

65

desvanecimiento del color de la hoja, reducción de carotenos en células y tejidos vegetales, reducción de otros pigmentos en células y tejidos vegetales, etc.

- 5 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de hierro en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de hierro: clorosis blanca intervenal de hojas jóvenes primero, clorosis de los tejidos aéreos, necrosis de los tejidos aéreos, blanqueado de hojas, agostamiento de los bordes y puntas de las hojas, etc.
- 10 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de magnesio en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de magnesio: clorosis por moteado con venas verdes y tejido reticular en las hojas amarillo o blanco sobre las hojas viejas primero, marchitamiento de las hojas, formación de capas de ascisión en las hojas en la ausencia de la etapa de marchitamiento, necrosis de las células y tejidos vegetales, etc.
- 15 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de manganeso en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de manganeso: clorosis por moteado con venas verdes y tejido reticular de la hoja amarillo o blanco en hojas jóvenes primero, luego esparcimiento a las hojas viejas, tallo verde amarillento, el endurecimiento y/o leñosidad en los tallos, reducción de carotenos, etc.
- 20 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de molibdeno en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia en los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de molibdeno: clorosis amarillo claro de hojas, fallo en la expansión de la lámina de la hoja, etc.
- 25 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de nitrógeno en la planta, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de nitrógeno: crecimiento marchitamiento de la planta de plantas jóvenes, hojas amarillo verdosas en plantas jóvenes, hojas verde pálido en hojas más viejas seguido por amarillamiento y secado o desprendimiento, acumulación incrementada de antocianinas en venas, tallos delgados, apariencia ahusada de la planta, floración reducida, etc.
- 30 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de fósforo en las plantas, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia en los siguientes síntomas de limitantes de la deficiencia fósforo: marchitamiento de plantas jóvenes, hojas azul verdosas con subtonos púrpura, tallos delgados, acumulación incrementada de antocianinas en hojas, necrosis de hojas, cesación del crecimiento meristemático, tasa disminuida de la maduración de la fruta, enanismo en la planta en la madurez, etc.
- 35 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de potasio en las plantas puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de potasio: hojas verde oscuras, hojas monocotiledóneas verde pálido, ruptura y amarillamiento de hojas de monocotiledóneas, clorosis marginal de hojas, necrosis de hojas que aparece primero en hojas viejas, arrugas en venas, corrugado de venas, quebrantamiento de venas, etc.
- 40 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de azufre en las plantas puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de azufre: hojas verde claro a amarillo que aparecen primero a lo largo de las venas de las hojas jóvenes, tallos delgados, etc.
- 45 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista capaz de modular los niveles de zinc en las plantas, puede ser capaz de prevenir, detectar, aliviar y/o conferir resistencia a los siguientes síntomas no limitantes de la deficiencia de zinc: clorosis de hojas y/o necrosis de hojas que afectan primero hojas jóvenes, roseteado, formación prematura de capas de ascisión en hojas, manchas cloróticas blancas entre venas en hojas viejas, whiting de las hojas superiores en monocotiledóneas, clorosis de las hojas inferiores en dicotiledóneas, etc.
- 50 Síntomas adicionales de deficiencias en nutrientes en plantas son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Noggle, G. R., and Fritz, G. J., in "Introductory Plant Physiology", 2<sup>d</sup> edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1983).
- 55 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede ser capaz de modular los niveles de nutrientes en plantas bien sea directa o indirectamente incrementando la actividad, cinética y/o expresión del transporte de proteínas, canales iónicos y/o proteínas portadoras de iones.
- 60 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede ser capaz de modular los niveles de nutrientes en plantas bien sea directa o indirectamente incrementando o induciendo a la secreción de compuestos solubilizantes de minerales o estabilizantes de minerales o compuestos quelantes (por ejemplo, ácido cítrico, ácido málico, ácido pídico, etc.).
- 65

Alternativamente, el compuesto secretado puede ser un compuesto quelante orgánico (por ejemplo, fitometalóforo, véase por ejemplo, Cakmak et al., *Plant Soil*, 180: 183-189, (1996)).

5 Alternativamente, el compuesto secretado es un exudado de raíz, tal como un ácido orgánico (por ejemplo, láctico, acético, fórmico, piruvico, succínico, tartarico, oxálico, cítrico, isocítrico, aconítico, etc.), carbohidrato, aminoácido o polisacárido capaz de asimilar carbóno (véase, por ejemplo, Paul, E. A., and Clark, F. E., in "Soil microbiology and biochemistry", Academic Press, San Diego, (1989)).

10 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede ser capaz de modular los niveles de nutrientes en plantas modulando, bien sea directa o indirectamente, la actividad, cinética y/o expresión de enzimas fosfatasa, enzimas nitrato reductasa, enzimas citrato sintetasa, etc.

15 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede ser capaz de modular los niveles de nutrientes en plantas modulando los niveles de transporte activo y/o transporte pasivo de las plantas. Alternativamente, un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede ser capaz de modular los niveles de nutrientes en plantas modulando el transporte inter e intratejidos y/o celular de los nutrientes en las plantas (por ejemplo, transporte a través del floema, xilema, desmosomas, etc.). Mecanismos adicionales para modulación del transporte de nutrientes en plantas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Lambers, H., et al., in "Plant Physiological Ecology", Springer-Verlag, New York, (1998)).

20 Asociaciones bióticas

25 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede incrementar la capacidad de las plantas, bien sea directa o indirectamente, para iniciar y/o mantener asociaciones bióticas con otros organismos. Tales asociaciones pueden ser sinbióticas, no sinbióticas, endosinbióticas, macrosinbióticas y/o microsinbióticas en su naturaleza. En general, un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede incrementar la capacidad las plantas para formar asociaciones bióticas con cualquier miembro de los reinos filums, familias, clases, géneros y/o especies fúngicos, bacterianos, líquenes, micorrizas, cianobacterianos, dinoflagelados y/o algas.

30 Ejemplos específicos, no limitantes de organismos que se sabe que forman asociaciones bióticas con las plantas son ectomicorrizas (por ejemplo, miembros de las Diperocarpaceae, Pinaceae, Fagaceae, Myrtaceae, Salicaceae, Betulaceae, Fabaceae, etc.), endomicorriza, micorriza vesicular arbuscular (por ejemplo, miembros de los Glomales) nomicorrizas (por ejemplo, miembros de tge Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Lecythideceae, Proeaceae, Restionaceae, Sapotaceae, Urticaceae, Zygophyllaceae, etc.), organismos simbióticos fijadores de N<sub>2</sub> (por ejemplo, miembros de Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Azorhizobium, etc.), organismos no simbióticos fijadores de N<sub>2</sub> (por ejemplo, Azospirillum, etc.), organismos endosimbióticos (por ejemplo, Clavicipitaceae, Ascomycetes, etc.), etc. organismos adicionales capaces de formar asociaciones bióticas con plantas son conocidos en la técnica y están abarcados por la invención (véase por ejemplo, Lambers, H., et al., in "Plant Physiological Ecology", Spinger- Verlag, New York, (1998); Raven, P. H., et al., in "Biology of Plants", 5th Edition, Worth Publishers, New York, (1992). El mecanismo por el cual un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede incrementar la capacidad las plantas, bien sea directa o indirectamente, para iniciar y/o mantener asociaciones bióticas es variable, aunque puede incluir, secreciones moduladas de ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, nutrientes o la expresión incrementada de una proteína requerida para las interacciones de los organismos huésped -biótico (por ejemplo, un receptor, ligando, etc.). Mecanismos adicionales son conocidos en la técnica y son abarcados por la invención.

50 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede disminuir la capacidad de una planta para formar asociaciones bióticas con una planta. Tal descenso puede deberse al incremento en la capacidad de las plantas para utilizar, obtener, almacenar y/o sintetizar nutrientes esenciales que el organismo biótico suministraba a la planta a través de la asociación.

55 Los mecanismos por los cuales una planta podría inhibir la colonización de organismos bióticos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Smith, S. E., and Read, D. J., in "Mycorrhizal Symbiosis", Academic Press, London, 1997, etc.). Por ejemplo, en los suelos de bajo contenido de fósforo, una planta puede formar colonización simbiótica benéfica con la especie capaz de proveer fósforo. Sin embargo, en suelos con alto contenido de fósforo, tal colonización podría ser inhibida por la planta. Así, un polinucleótido o péptido puede incrementar la capacidad de la planta para vivir en suelos con bajo fósforo permitiendo que la planta asimile el fósforo a través del mecanismo previamente no endógeno en la planta, por ejemplo.

60 Feromonas

65 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede incrementar la capacidad de las plantas para sintetizar y/o liberar una feromona. Tal feromona pueda crear organismos predadores a la planta que pueden alimentarse con las plagas de la planta o agentes infecciosos de la misma. Por ejemplo, estudios recientes del áfido *Acyrtosiphon pisum* han demostrado que la alimentación con el áfido altera la composición de los volátiles liberados por la planta y que estos compuestos actúan como sinomonos para los parasitoides que se alimentan de los áfidos, *Aphidius ervi*. Estudios adicionales han demostrado que otras feromonas liberadas por la planta en respuesta el

consumo por áfidos, a saber (E)-beta-farneseno, pueden atraer también otros predadores de áfidos, tales como la crisopa *Chrysoperla carnea* y la mariquita de siete manchas, *Coccinella septempunctata*.

5 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede modular la biosíntesis y/o liberación de feromonas, volátiles que tienen efectos similares a feromonas, volátiles que tiene efectos de kairomona, volátiles que tienen efectos de sinomonas y/o puede liberar específicamente (C)-beta-farneseno. Alternativamente, un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede modular la liberación de feromonas, indirectamente, a través de la inducción de los siguientes compuestos no limitantes, compuestos de la ruta de señalización octadecanoide, conjugados de aminoácidos no relacionados estructuralmente tales como la fitotoxina coronatina bacteriana, el indanoil-isoleucina sintético, o conjugados de aminoácidos de terpenoides linolenicos, y/o volátiles, tales como miembros de los sesqui-diterpenoides. Preferiblemente, cualquiera de las feromonas y/o volátiles liberadas de la planta, o inducidos, por un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista tienen efectos moduladores en el comportamiento de los predadores de plagas de las plantas y/o en las plagas de las plantas y son conocidos en la técnica (véase, (see, Boland W., et al., *Novartis Found Symp*, 223: 110-26 (1999); Wadhams LJ., *Novartis Found Symp*, 223: 60-7 (1999); Tumlinson JH, et al., *Novartis Found Symp*, 223: 95-105 (1999)).

20 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonistas o antagonistas pueden modular la biosíntesis de furanonas. Las furanonas son compuestos de origen natural que se encuentran en una variedad de plantas y que han demostrado tener efectos similares a las feromonas, efectos antibacterianos, efectos antivirales, etc., sobre una variedad de organismos. Por ejemplo, la 5-metil-4-hidroxi-3(2H)-furanona es una feromona de los machos en la cucaracha *Eurycolis florionda* (Walker) y el derivado 2,5-dimetililo interrumpe el crecimiento fúngico sobre fresas y es un importante componente del aroma atractivo de la fruta. El alga roja *Delisea pulchra* (Greville) Muntagne produce un rango de furanos bromados que previenen la colonización de las plantas por bacterias interfiriendo con la homoserina lactona acilada (AHL), en su sistema de señalización utilizado por las bacterias para detección de quórum. Además, las feromonas han demostrado tener propiedades mutagénicas en las bacterias y virus, y así podrían servir como antibacterianos y antivirales (Colin, Slaughter J, *Biol Rev Camb Philos Soc*, 74 (3): 259-76 (1999)).

30 Quimiotaxis

Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede tener actividad quimiotáctica. Una molécula quimiotáctica atrae o moviliza células a un sitio en particular en la planta o cuerpo animal, tal como inflamación, infección o sitio de hiperproliferación. Las células movilizadas pueden entonces luchar y/o curar el trauma o anomalía particular.

35 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede incrementar la actividad quimiotáctica de células en particular. Estas moléculas quimiotácticas pueden utilizarse entonces para detectar, prevenir y/o aliviar inflamación, infección, enfermedades hiperproliferativas, trastornos y/o condiciones, o cualquier trastorno de la planta incrementando el número de células objetivo para una localización particular en el cuerpo de la planta. Por ejemplo, las moléculas quimiotácticas pueden ser utilizadas para prevenir y/o diagnosticar heridas u otros traumas en los tejidos atrayendo células a la localización lesionada.

45 También se contempla que un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede inhibir la actividad quimiotáctica. Estas moléculas podrían ser utilizadas para detectar, prevenir y/o aliviar enfermedades, trastornos y/o condiciones. Así, un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista podría ser utilizado como inhibidor de quimiotaxis.

50 Un polinucleótido o polipéptido y/o agonista o antagonista puede modular la capacidad de una planta para detectar la presencia plantas vecinas (esto es, quimiopercepción). Tal modulación quimioperceptiva puede venir en la forma de detección de la presencia de hormonas vegetales (por ejemplo, jasmonato, etc.), diferenciales de intercambio de calor y/o detección aleloquímica (véase, por ejemplo, Boller, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 189-214, (1995)).

55 Actividad de enlazamiento

Un polipéptido puede utilizarse para seleccionar moléculas que se enlazan al polipéptido o para moléculas a las cuales se enlaza el polipéptido. El enlazamiento del polipéptido y la molécula puede activar (agonista), incrementar, inhibir (antagonista), o disminuir la actividad del polipéptido o de la molécula enlazada. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (por ejemplo, receptores), o moléculas pequeñas.

60 Preferiblemente la molécula es una cercanamente relacionada con el ligando natural del polipéptido, por ejemplo, un fragmento del ligando, o sustrato natural, o un ligando, un imitador estructural o funcional (véase, Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1 (2): Chapter 5 (1991)). De la misma forma, la molécula puede relacionarse cercanamente con el receptor natural al cual se enlaza el polipéptido, o al menos, un fragmento del receptor capaz de ser enlazado por el polipéptido (por ejemplo, sitio activo). En cualquier caso, la molécula puede diseñarse racionalmente utilizando técnicas conocidas.

65

Preferiblemente, la selección para estas moléculas involucra la producción de células apropiadas que expresen el polipéptido, bien sea como a una proteína secretada o sobre la membrana celular. Células preferidas incluyen células de plantas, levaduras o *E. coli*. Las células que expresan el polipéptido (o la membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen entonces preferiblemente en contacto con un compuesto de prueba que contiene potencialmente la molécula para observar el enlazamiento, estimulación o inhibición de la actividad bien sea del polipéptido o de la molécula. Además, la identificación de tales moléculas puede obtenerse a través de la aplicación del sistema híbrido de levadura dos o tres (véase por ejemplo, Wallach D, et al., *Curr Opin Immunol.*, 10 (2): 131-6, (1998); Young KH., *Biol Reprod.*, 58 (2): 302-11, (1998); and Fernandes, PB., *Curr Opin Chem Biol.*, 2 (5): 597-603 (1998)). Adicionalmente, la identificación de tales moléculas puede obtenerse a través de la aplicación de tecnologías de selección adicionales que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes patentes emitidas de los Estados Unidos: 5,284,746; 5,576,210; 5,691,188; 5,846,819; y la publicación internacional No. WO 95/34646.

El ensayo puede simplemente probar el enlazamiento de un compuesto candidato al polipéptido, cuando el enlazamiento se detecta mediante un marcador, o en una prueba que involucra competición y un competidor marcado. Adicionalmente, el ensayo puede probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por el enlazamiento al polipéptido.

Alternativamente, la prueba puede llevarse a cabo utilizando preparaciones libres de células, péptidos/moléculas fijados a un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. La prueba también puede comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene polipéptido, medir la actividad o enlazamiento polipéptido/molécula, y comparar la actividad o enlazamiento polipéptido/molécula con un estándar.

Preferiblemente, una prueba ELISA puede medir el nivel o actividad del polipéptido en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o actividad del polipéptido bien sea enlazándose, directa o indirectamente, al polipéptido o compitiendo con el polipéptido por un sustrato.

Como una aproximación alternativa para la identificación del receptor, los polipéptidos marcados pueden ser enlazados por fotoafinidad con la membrana o preparaciones en extracto que expresen la molécula del receptor. El material entrecruzado se resuelve por análisis PAGE y se exponen a una película de rayos X.

El complejo marcado que contiene los receptores de los polipéptidos puede ser suprimido, resuelto en fragmentos péptidicos, sometido a microsecuenciamiento de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida del microsecuenciamiento sería utilizada para diseñar una serie de sondas de oligonucleótidos degenerados para seleccionar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican los receptores putativos.

Adicionalmente, las técnicas de barajado de genes, barajado de estructuras, barajado de exón y/o barajado de codón (colectivamente denominado como "barajado de ADN") puede emplearse para modular las actividades de los polipéptidos de la invención generando efectivamente por lo tanto agonistas y antagonistas de polipéptidos de la invención. Véase general, las patentes de los Estados Unidos 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, and 5,837,458, y Patten, P. A., et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 724-33(1997); Harayama, S. *Trends Biotechnol.* 16 (2): 76-82 (1998); Hansson, L. O., et al., *J. Mol. Biol.* 287 : 265-76 (1999); and Lorenzo, M. M. and Blasco, R. *Biotechniques* 24 (2): 308-13 (1998). Las técnicas de barajado de ADN son conocidas en la técnica y se describen más particularmente en este documento.

Todos los ensayos referenciados más arriba, y en otros lugares aquí, pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas utilizando estas pruebas pueden ser utilizadas para detectar, prevenir y/o conferir resistencia a una enfermedad o para traer un resultado particular organismo (por ejemplo, crecimiento de vasos, etc.) activando o inhibiendo el polipéptido/molécula.

Además, los ensayos pueden descubrir agentes que puedan inhibir o potenciar la producción de los polipéptidos de la invención a partir de células o tejidos manipulados adecuadamente.

Por lo tanto, la invención incluye un método para identificar compuestos que se enlazan a los polipéptidos de la invención que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto que se enlaza a un candidato con el polipéptido; y (b) determinar si el enlazamiento ha ocurrido. Además, la invención incluye un método para identificar agonistas/antagonistas que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato con el polipéptido, (b) ensayar una actividad biológica, y (b) determinar la actividad biológica del polipéptido que ha sido alterado.

Antisentido y Ribozima (Antagonistas)

En realizaciones preferidas, la invención abarca antagonistas que corresponden a la secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO: X y/o las cadenas complementarias de las mismas. La tecnología antisentido da como resultado la modulación (esto es, inhibición completa o parcial), de la expresión de una proteína particular a través de la inhibición directa del ARNm de las proteínas. Los ácidos nucleicos antisentido pueden estar en la forma de ADN, ARN, APN, hélice triple, hélice cuádruple, una mezcla quimérica de cualquiera de estos tipos antes mencionados (por ejemplo, ADN: ARN, APN: ARN, APN: ADN, etc.), y puede ser de cadena sencilla o doble. Los

ácidos nucleicos antisentido modulan la expresión genética enlazándose al ARN del gen de interés, inhibiendo efectivamente la traducción. Tales interacciones pueden basarse en seguir el típico reconocimiento de bases de pares de Watson-Crick, o en el caso de una hélice triple o cuádruple, pueden basarse en el reconocimiento de pares de bases Hoogsteen.

5 Los ácidos nucleicos antisentido pueden generarse en forma transiente dentro del organismo (por ejemplo, secuencia contenida dentro de un vector expresado inducible o constitutivamente introducido en las células de un organismo), generado de forma estable dentro del organismo (por ejemplo, secuencia contenida dentro de un vector inducible o expresado constitutivamente las células del organismo utilizando métodos transgénicos, que incluyen integración vial, etc.), o puede ser administrado de forma exógena.

10 Para que un ácido nucleico cumpla su papel antisentido, solamente es necesario que tenga homología de secuencia con el producto ARN sentido del gen de interés. La invención abarca un cierto número de métodos para administrar ácidos nucleicos antisentido, sus composiciones y diseños que son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Agrawal S, et al., *Mol Med Today*.2000 Feb; 6 (2): 72-81; Yacyszyn BR, et al, *Can J Gastroenterol*. 1999 Nov; 13 (9): 745-51; Mrsny RJ., *J Drug Target*. 1999; 7(1): 1-10; Toulme JJ, et al, *Nucleic Acids Symp Ser*. 1997; (36): 39- 41.), Okano, *Neurochem.*, 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988); and Cooper SR, et al., *Pharmacol Ther*. 1999 May-Jun ; 82 (2-3): 427-35). De la misma forma, se desarrollado un cierto número de métodos relacionados con la aplicación de la tecnología antisentido de hélice triple para modular la expresión genética (véase, por ejemplo, Gowers DM, et al, *Nucleic Acids Res*. 1999 Apr 1; 27 (7): 1569-77; and Chan PP, et al., *J Mol Med*. 1997 Apr; 75 (4): 267-82). La tecnología antisentido tiene aplicaciones de amplio rango en plantas, por ejemplo, el ARN antisentido ha demostrado subregular efectivamente una variedad de genes vegetales tal como lo describe Shimada, et al., *Theor. Appl. Genet.*, 86 : 665-672, (1993); Kull, et al., *J. Genet. Breed.*, 49: 67-76, (1995). Slabas and Elborough, WO 97/07222; Knutzon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2624-2628, (1992), and Baulcombe DC., *Plant Mol Biol*. 1996 Oct; 32 (1- 2): 79-88).

25 Los ácidos nucleicos antisentido comprenden una secuencia complementaria a al menos una porción del transcrito de ARN de un gen de interés. Sin embargo, no se requiere una complementariedad absoluta, aunque se prefiere. Una secuencia "complementaria a al menos una porción de un ARN", tal como se denomina aquí, se refiere a una secuencia que tiene complementariedad suficiente para ser capaz de hibridizar con el ARN, formando un dúplex estable, en el caso de ácidos nucleicos antisentido de doble cadena de la invención, una cadena sencilla del ADN dúplex puede ser probadas así, o puede probarse la formación de triplex. La capacidad para hibridizar dependerá tanto del grado de complementariedad como la longitud del ácido nucleico antisentido. En general, cuanto mayor sea el ácido nucleico hibridizante, mayores incongruencias podrá contener con respecto a una secuencia de ARN de la invención y aún formar un dúplex estable (o triplex cuando sea el caso). Una persona experimenta en la técnica puede establecer grado tolerable de discordancia mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridizado.

40 Los oligonucleótidos antisentido que son complementarios al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de inicio AUG, debería trabajar lo más eficientemente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm han demostrado ser efectivas en la inhibición de la traducción del ARNm también. Véase en general, Wagner, R., *Nature*, 372: 333-335 (1994). Así, los oligonucleótidos complementarios bien sea a las regiones no codificantes 5' o 3' no traducidas de una secuencia de polinucleótidos de la invención podrían ser utilizadas en la aproximación antisentido para inhibir la traducción de ARNm endógeno. Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida 5' del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG.

50 Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones de codificación de ARNm son inhibidores menos eficientes de la traducción pero podrían ser usados de acuerdo con la invención. Se diseñan para hibridizar la región de codificación 5', 3' del ARN, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud, y ser preferiblemente oligonucleótidos que varíen desde 6 a 50 nucleótidos en longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

55 El oligonucleótido antisentido puede modificarse en la unidad estructural básica, unidad estructural azúcar, o esqueleto fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos anexos tales como péptidos, o gantes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652; publicación PCT No. WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988), o barrera sangre cerebro (véase por ejemplo, la publicación PCT No. WO 89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de ruptura disparados por la hibridización (véase, por ejemplo, Krol et al., 1988, *BioTechniques* 6: 958- 976) o gantes de intercalación (véase, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549).

60 El oligonucleótido también puede ser basado en un ácido péptidonucleico ("PNA") sobre un esqueleto enlazado N-(2-aminoetil) glicina al cual se han unido las bases de ADN normal (Egholm et al., 1993, *Nature* 365: 566-67). Este PNA obedece al apareamiento de bases específico de Watson-Crick, pero con mayor energía libre de enlazamiento y por lo tanto con temperaturas de fusión más altas. Los oligómeros adecuados pueden construirse enteramente a partir de PNAs o de oligómeros de PNA y ADN y/o ARN mixtos.

En efecto, las quimeras PNA: ADN han incrementado las características de solubilidad, en comparación con las quimeras ADN: ADN o ADN: ARN de la misma secuencia. De forma más notable, los PNA tienen la capacidad única de desplazar una cadena de la hélice doble de ADN haciéndola así más adecuada en las aplicaciones antisentido (Uhlmann E., *Biol Chem.* 1998 Aug-Sep; 379 (8- 9): 1045-52).

5 El oligonucleótido puede comprender al menos un esqueleto fosfato modificado seleccionado del grupo consistente de fosforotioato, fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforoamidato, un fosforodiamidato, un metifosfonato, un aquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

10 El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos una unidad estructural base modificada que selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hyviruelaanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5- (carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2- thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2- methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D- mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2- thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid-methylester, 3- (3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, y 2,6-diaminopurine.

20 El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos una unidad estructural azúcar modificada seleccionada del grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

25 El oligonucleótido antisentido puede ser conjugado con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento disparado por hibridización, un agente de transporte, un agente de ruptura disparado por hibridización, etc.

30 Los oligonucleótidos antisentido puede sintetizarse por métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automático de ADN (tal como los que están disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligos fosforotioatos pueden sintetizarse por el método de Stein et al. (1988, *Nucl. Acids Res.* 16 : 3209), los oligos metilfosfonato pueden prepararse mediante el uso de soportes poliméricos de vidrio poroso controlado (Sarin et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7448-7451), etc.

35 El oligonucleótido puede comprender ARN catalítico o una ribozima (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 octubre 1990 ; Sarver et al., 1990, *Science* 247: 1222-1225; Hasselhoff, et al., *Nature* 342: 76-79 (1988)).

40 Las ribozimas han sido utilizadas para subregular la expresión genética, y más recientemente en la subregulación de proteínas vegetales (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO 97/10328). En otra realización, el oligonucleótido es un 2'-0-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, *Nucl. Acids Res.* 15: 6131-6148), o un análogo quimérico ARN-ADN (Inoue et al., 1987, *FEBS Lett.* 215: 327-330).

45 Otras Actividades

50 En otra realización, los polipéptidos, polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, y valientes pueden utilizarse para inhibir la expresión genética utilizando metodología de cosupresión. El mecanismo de cosupresión no es conocido, aunque su aplicación para inhibir la expresión genética de plantas ha sido documentada y descrito (e. g., Seymour, et al., *Plant.Mol. Biol.*, 23: 1-9, (1993), Brusslan, et al., *Plant Cell*, 5: 667-677, (1993); Vaucheret, et al., *Mol. Gen. Genet.*, 248 : 311-317, (1995); and Jorgensen, et al., *Plant Mol. Biol.*, 31: 957-973, (1996)). La cosupresión involucra la creación de un constructo de vector expresado de forma constitutiva que comprende, por ejemplo, el promotor CaMV 35S, la región de codificación 5' de un primer gen (R) por el cual se desea la expresión inhibida, en marco y corriente arriba de, la región codificadora completa de un segundo gen (S) para el cual se desea la expresión inhibida, y un terminador. Por transformación positiva de las plantas con este vector (esto es plantas transgénicas) no se detectará una expresión detectable del ARNm ni para R ni para S (véase Seymour, supra).

55 El polipéptido o polinucleótidos de la presente invención puede incrementar o disminuir también la diferenciación o la proliferación de las células del protoplasto, células del emiloblasto, etc.

60 El polipéptido o polinucleótidos de la presente invención pueden ser útiles en la modulación de la muerte programada de células en plantas, células de plantas, células eucarióticas y organismos, en general. Tal modulación sería bien a través de interacción directa o indirecta entre un polipéptido o polinucleótidos de la presente invención con el gen o proteína crítica en la modulación de la muerte programada de células en el organismo. Objetivos específicos interacción para muerte celular programada, particularmente en una planta, están provistos de la publicación internacional número WO 00/04173 (por ejemplo, genes de poli-ADP-riboza polimérica (PARP), específicamente genes PARP de la clase ZAP, etc.).

65

El polipéptido o polinucleótidos de la presente invención también puede utilizarse para modular características de plantas tales como altura del tallo, pigmentación, tolerancia de estrés, etc. De la misma forma, los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados para modular el metabolismo de las plantas que afecta el catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización y almacenamiento energía.

5 Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención también pueden ser usados como aditivo o preservativo para alimentos, tales como para incrementar o disminuir la capacidad de almacenamiento, el contenido de grasa, lípido, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, cofactores u otros componentes nutricionales.

#### 10 Otras Realizaciones Preferidas

También se prefiere una molécula de ácido nucleico donde dicha secuencia de nucleótidos contiguos está incluida en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: X en el rango de posiciones que comienzan con el nucleótido en aproximadamente la posición de "5' NT del clon" y termina con el nucleótido hacia aproximadamente la posición del "3' NT del clon" tal como se define para SEQ ID NO: X en la Tabla 1.

También se prefiere una molécula de ácido nucleico donde dicha secuencia de nucleótidos contiguos está incluida en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: X en el rango de posiciones que comienzan con el nucleótido de aproximadamente la posición "5' NT del codón de inicio del clon ORF" y termina con el nucleótido en aproximadamente la posición "3' NT del clon ORF" tal como se define en SEQ ID NO: X en la Tabla 1.

De la misma forma también se prefiere una molécula de ácido nucleico donde dicha secuencia de nucleótidos contiguos está incluida en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: X en el rango de posiciones que comienzan con el nucleótido en aproximadamente la posición del "5' NT del primer AA del péptido señal" y termina con el nucleótido en aproximadamente la posición del "3' NT del clon ORF" como se define para SEQ ID NO: X en la Tabla 1.

Una realización preferida adicional es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos la cual es al menos 95% idéntica a la secuencia nucleótidos de SEQ ID NO: X que comienza con el nucleótido en aproximadamente la posición del "5' NT del clon ORF" y termina con el nucleótido en aproximadamente la posición del "3' NT del clon ORF" tal como se define para SEQ ID NO: X en la Tabla 1.

Una realización preferida adicional es una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos completa de SEQ ID NO: X.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que hibridiza bajo condiciones de hibridización restrictivas en una molécula de ácido nucleico, donde dicha molécula de ácido nucleico que hibridiza no hibridiza bajo condiciones de hibridización restrictivas a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste solamente de residuos A o solamente de residuos T.

Una realización descrita adicional es un método para detectar en una muestra biológica una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95% idéntica con la secuencia al menos 50 nucleótidos contiguos en una secuencia seleccionada del grupo consistente de: una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: X donde X es cualquier entero como se define en la Tabla 1; método que comprende una etapa de comparar una secuencia de nucleótidos de al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra con una secuencia seleccionada de dicho grupo y determinar si la secuencia de dicha molécula de ácido nucleico en dicha muestra es al menos 95% idéntica a dicha secuencia seleccionada.

También se describe el método anterior donde dicha etapa de secuencia de comparación comprende determinar el grado de hibridización de ácidos nucleicos entre las moléculas de ácido nucleico en dicha muestra y una molécula de ácido nucleico que comprende dicha secuencia seleccionada de dicho grupo. De la misma forma, también se prefiere el método anterior donde dicha etapa de comparar se lleva a cabo comparando la secuencia nucleótidos determinada a partir de una molécula de ácidos nucleicos en dicha muestra con dicha secuencia seleccionada de dicho grupo. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender moléculas de ADN no moléculas de ARN.

Una realización descrita adicional es un método para identificar las especies, tejido o tipo celular de una muestra biológica método que comprende una etapa de detectar moléculas de ácido nucleico en dicha muestra, si lo hay, comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que sea al menos 95% idéntica a una secuencia de al menos 50 nucleótidos contiguos en una secuencia seleccionada del grupo consistente en: una secuencia nucleótidos de SEQ ID NO: X donde X es un entero como se define en la Tabla 1.

El método para identificar la especie, tejido o tipo de célula de una muestra biológica puede comprender una etapa de detectar las moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos en un panel de al menos dos secuencias de nucleótidos, donde al menos una secuencia en dicho panel es al menos 95% idéntica a la secuencia de al menos 50 nucleótidos contiguos en una secuencia seleccionada de dicho grupo.

65

También se prefiere un polipéptido, donde dicha secuencia de aminoácidos contiguos está incluida en la secuencia aminoácidos de SEQ ID NO: Y en el rango de posiciones "AA total del marco de lectura abierto (ORF)" como se establece para SEQ ID NO: Y en la Tabla 1.

5 Se prefiere adicionalmente un polipéptido aislado que comprenda una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: Y.

10 También se prefiere una molécula de ácido nucleico aislado, donde dicha secuencia nucleótidos que codifica un polipéptido ha sido optimizada para la expresión de dicho polipéptido en un huésped procarótico.

También se prefiere una molécula de ácido nucleico aislada, donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: Y.

15 Se prefiere adicionalmente un método para hacer un vector recombinante que comprende insertar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico antes aisladas en un vector. También se prefiere el vector recombinante producido por este método. También se prefiere un método para hacer una célula huésped recombinante que comprende introducir el vector en una célula huésped, así como la célula huésped recombinante producida por este método.

20 Las aplicaciones antes citadas tienen usos en una gran variedad de huéspedes. Tales huéspedes incluyen, pero no se limitan a, cebada, avena, centeno, sorgo, guisantes, girasol, tabaco, algodón, petunias, tomate, brócoli, lechuga, manzana, ciruela, naranja y limón, y más preferiblemente arroz, maíz, canola, trigo, remolacha de azúcar, caña de azúcar y soja, además de otros huéspedes citados en el presente documento.

25 Habiendo descrito en general la invención, la misma será más fácilmente entendida como referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a manera de ilustración pero no deben entenderse como limitantes.

### Ejemplos

30 Ejemplos 11, 12, 14, 21, 22, 28 y 31 a 34 son ejemplos comparativos.

#### Ejemplo 1- Crecimiento de Cultivos de *Physcomitrella patens*

35 Para este estudio, se usaron plantas de la especie *Physcomitrella patens* (Hedw) B.S.G. De la sección de estudios genéticos de la Universidad de Hamburgo. Se originaron de la cepa 16/14 recolectada por H. L. K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire (Inglaterra) que fueron subcultivados a partir de una spora de Engel (1968, AmJ Bot 55,438-446). La proliferación de las plantas se llevó a cabo por medio de esporas y por medio de regeneración de los gametotipos. El protonema desarrollado a partir de la spora haploide como un cloronema rico en cloroplastos y caulonema bajo en cloroplastos, sobre el cual se formaron los yemas después de aproximadamente 12 días. Creación hasta dar gametóforos que portaban anteridias y arquegonias.

40 Después de la fertilización, resultaron el esporofito diploide con una corta seta y la cápsula de esporas, en la cual maduraron las meiosporas.

45 El cultivo fue llevado a cabo en una cámara climática a temperatura de aire de 25 °C y una intensidad de luz de 55 micro-mols-lm<sup>2</sup> (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25) y un cambio de luz/oscuridad 16/8 horas. El moho fue modificado en cultivo líquido utilizando medio Knop de acuerdo con Reski y Abel (1985, Planta 165, 354-358) o cultivado sobre medio sólido Knop utilizando agar oxid al 1% (Unipath, Basingstoke, Inglaterra).

50 Los protonemas utilizados para el aislamiento de ARN y ADN fueron cultivos en cultivos líquidos aireados. Los protonemas fueron triturados cada nueve días y transferidos a un medio de cultivo fresco.

#### Ejemplo 2- Aislamiento de ARN total y construcción de bibliotecas de Poli-(A)+ARN y ADNc a partir de *Physcomitrella patens*

55 Para la investigación de los transcriptos, se aislaron tanto el APN total como los poli-(A)+ARN. El ARN total fue obtenido a partir de protonemas tipo silvestre de nueve días de edad siguiendo el método GTC (Reski et al. 1994, Mol. Gen. Genet., 244:352-359).

60 El poli(A)+ARN fue aislado utilizando Dyna Beads<sup>R</sup> (Dyna, Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante. Después de la determinación de la concentración de ARN o del poli(A)+ARN, el ARN fue precipitado por adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.6 y dos volúmenes de etanol y se almacenó a -70 °C.

Preparación de ARN a partir de semillas de *Arabidopsis*-(extracción) "en caliente":

65 1.Reguladores, enzimas y soluciones.

- KCl 2M
  - Proteinasa K
  - Fenol (para ARN)
  - Cloroformo:Isoamilalcohol (Fenol:cloroformo 1:1; pH ajustado para el ARN)
  - LiCl 4M, tratado con DEPC
  - agua tratada con DEPC
  - NaOAc 3M, pH 5, tratado con DEPC
  - Isopropanol
  - etanol al 70% (hecho con agua tratada con DEPC)
  - regulador de la resuspensión: 0.5% SDS, Tris pH 7.5 10 mM, EDTA 1 mM hecho con agua tratada con DEPC, puesto que esta solución no puede ser tratada con DEPC
  - regulador de extracción
- Borato de sodio 0.2M  
EDTA 30 mM  
EGTA 30 mM  
SDS al 1% \*(20ul de solución SDS al 10% para 2.5ml de regulador)  
1% de Desoxicolato (25mg para 2,5ml de regulador)  
2% de PVPP (insoluble- 50mg por 2.5ml de regulador)  
2% PVP 40K (50mg para 2.5ml de regulador)  
DTT \*10mM  
Mercaptoetanol \* 100mM (fresco, manejado bajo cabina de extracción –útese 35ul de solución 14.3M para 5ml de regulador)
2. Tracción
- Se calienta el regulador de extracción hasta 80 °C. Se tritura el tejido en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, se transfiere el polvo del tejido a un tubo de 1.5 ml. El tejido debería mantenerse congelado hasta que se añada el regulador de manera que se transfiere la muestra con una espátula preenfriada y se mantiene el tubo en nitrógeno líquido todo el tiempo. Señalé 350ul de regulador de extracción precalentado (aquí para 100mg de tejido. El volumen del regulador puede ser tanto como 500ul para muestras más grandes) al tubo, se somete a vórtex y se calienta el tubo 80 °C durante aproximadamente un minuto. Se mantiene luego sobre hielo. La muestra somete a vórtex, se tritura adicionalmente con un mortero eléctrico.
3. Digestión
- Se añade proteinasa K (0.15mg/100mg de tejido), se somete a vórtex y se mantiene a 37 °C durante una hora.
4. Primera purificación
- Se añaden 27ul de KCl 2M. Se enfría sobre hielo durante 10 minutos. Se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo libre de RNasa y se hace de extracción con fenol, seguida por una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico. Se añade un volumen de isopropanol a sobrenadante y se enfría sobre hielo durante 10 minutos. Se separa la pella de ARN por centrifugación (7000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente). Se disuelve la pella en 1ml LiCl 4M sometiendo a vórtex durante 10 a 15 minutos. La pella de ARN se forma de nuevo por centrifugación durante cinco minutos.
5. Segunda purificación
- Se resuspende la pella en 500ul de regulador de resuspensión. Se añaden 500ul de fenol y se somete a vórtex. Se añaden 250ul de cloroformo: alcohol isoamílico y se somete a vórtex. Se rota durante cinco minutos, y el sobrenadante se transfiere a un tubo fresco. Se repite la extracción con cloroformo: alcohol isoamílico hasta que la interfase está clara. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se añaden 1/10 volúmenes de NaOAc 3M, pH 5 y 600ul de isopropanol. Se mantiene a -20° durante 20 minutos o más. Se forma la pella de ARN por centrifugación durante 10 minutos. Se lava la pella una vez con etanol al 70%. Se elimina todo el alcohol restante antes de redisolver la pella con 15 a 20ul de agua – DEPC. Se determina la cantidad y calidad midiendo la absorbancia a una dilución 1:200 a 260 y 280nm. 40ug de ARN/ml=10D260.
- Para la construcción de la biblioteca de ADNc primero se logra la síntesis de la cadena utilizando la transcriptasa reversa del virus de leucemia murino (Roche, Mannheim, Germany), y oligo-d(T)-cebadores, la síntesis de la segunda cadena por incubación con ADN polimerasa I, enzima de Klenow y digestión del ARNseH 12 °C (2h), 16 °C (1h) y 22 °C (1h). La reacción fue detenida por incubación a 65 °C (10 minutos) y se transfirió subsecuentemente a hielo. Las moléculas de ADN de doble cadena fueron unidas por la polimerasa T4 –ADN (Roche, Mannheim) a 17 °C (30 minutos). Los nucleótidos fueron retirados por extracción con fenol-cloroformo y columnas de rotación Sephadex G50. Se ligaron adaptadores EcoRI (Pharmacia, Freiburg, Alemania) a los extremos del ADNc mediante T4- ADN ligasa (Roche, 12 °C, durante la noche) y se fosforilo por incubación con polinucleótido quinasa (Roche, 37 °C, 30 minutos). Esta mezcla fue sometida a separación sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Las moléculas de

ADN de mayores de 300 pares de bases fueron eluidas del gel, extraídos con fenol, concentra sobre columnas Elutip-D (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) y se ligaron a los brazos del vector y se empacaron en fagos ZAPII lambda o fagos ZAP-Express lambda utilizando el kit Gigapack Gold (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) utilizando el material y siguiendo las instrucciones del fabricante.

5

### Ejemplo 3 - Secuenciamiento y anotación de la función EST de la *Physcomitrella patens*

Las bibliotecas de ADNc tal como se describen en el Ejemplo 2 fueron utilizadas para el secuenciamiento del ADN de acuerdo con los métodos estándar, en particular por el método de terminación de cadena utilizando el ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania). Se llevó a cabo la secuenciamiento aleatorio subsecuente a la recuperación preparativa del plásmido a partir de las bibliotecas de ADNc a través de una escisión de masa, retransformación y subsecuente siembra en placa de DH10 sobre placas de agar (detalles de material y protocolo de Stratagene, Amsterdam, Países Bajos). El ADN plásmido fue preparado haciendo crecer durante la noche cultivos de *E. coli* sobre medio Luria-Broth que contenían ampicilina (véase Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) sobre un robot de preparación de ADN Qiagen (Qiagen, Hilden) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Se utilizaron cebadores de secuenciamiento con las siguientes secuencias de nucleótidos:

Qiagen1: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 12)  
 Qiagen2: 5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3' (SEQ ID NO:13)  
 Qiagen3: 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3' (SEQ ID NO:14)

Las secuencias fueron procesadas y anotadas utilizando el paquete de software EST-MAX comercialmente suministrado por BIO-MAX (Munich, Alemania). El programa incorpora prácticamente todos los métodos de bioinformáticos importantes para la caracterización funcional y estructural de las secuencias de proteínas. Para referencia véase <http://pedant.mips.biochem.mpg.de>.

25

Los algoritmos más importantes incorporados en EST- MAX son:

FASTA: base de datos de secuencias muy sensible que busca con estimativos de significado estadístico; Pearson W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183: 63-98.

30

BLAST: base de datos de secuencias muy sensible que busca con estimativos de significado estadístico. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-10. PREDATOR: predicción de estructura secundaria de alta exactitud a partir de secuencias individuales y múltiples. Frishman, D. and Argos, P. (1997) 75% accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins*, 27:329-335.

35

CLUSTALW: alineación de secuencia múltiple. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.

40

TMAP: predicción de la región de transmembrana a partir de secuencias alineadas múltiplemente. Persson, B. and Argos, P. (1994) predicción de segmentos de transmembrana en proteínas utilizando alineamientos de secuencia múltiple. *J. Mol. Biol.* 237:182-192.

ALOM2: predicción de la región de transmembrana a partir de secuencias individuales. Klein, P., Kanehisa, M., and DeLisi, C. Prediction of protein function from sequence properties: A discriminant analysis of a database. *Biochim. Biophys. Acta* 787:221-226 (1984). Version 2 by Dr. K. Nakai.

45

PROSEARCH: detección de patrones de secuenciamiento de proteínas PROSITE Kolakowski L.F. Jr., Leunissen J.A.M., Smith J.E. (1992) ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function. *Biotechniques* 13, 919-921.

50

BLIMPS: busca similitud contra una base de datos de bloques sin brecha. J.C. Wallace and Henikoff S., (1992) PATMAT: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases, *CABIOS* 8:249-254. Written by Bill Alford.

### Ejemplo 4 - Identificación de ORF de *Arabidopsis*, soja y maíz correspondiente a la PrPasa

55

PpPrPasa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 1) fue identificada en EST-MAX a través del análisis BLAST. El acierto máximo del BLAST es un ORF desconocido de la *Arabidopsis*. El segundo y tercer aciertos son caax prenil proteasa humana y de levadura. El análisis adicional del ORF desconocido de *Arabidopsis* reveló que un ORF predicho a partir del análisis por ordenador, utilizando el programa Genefinder (P.Green and L.Hillier, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). El ORF se localiza sobre la cadena complementaria en el clon BAC AF007269.

60

(Número de acceso al Genbank, gen="A\_IG002N01.21) de 24979 a 28076.

Usando este ADNc de AtPrPasa de *Arabidopsis* predicho con ordenador, la búsqueda con BLAST en diversas bases de datos de maíz y soja ha identificado una ZmPPasa EST (SEQ ID NO:9) de maíz y una GmPPasa EST (SEQ ID NO:7 de soja).

65

**Ejemplo 5 - Clonación de los ADNc de Arabidopsis codificando la PrPasa**

Aislamiento ARN total a partir de Arabidopsis thaliana

5 El ARN total fue obtenido partir de Arabidopsis thaliana de 14 días de edad tipo silvestre siguiendo el método de Van Slogteren (1983 Plant Mol. Biol. 2: 321-333.) Con ligeras modificaciones. Se congeló tejido (200mg) con nitrógeno líquido y se trituro hasta un polvo fino con un mortero y pistilo. El polvo fue colocado en un tubo de microfuga y se extrajo el ARN con 500ul del regulador de extracción (fenilo:0.1M LiCl, Tris-HCL [pH8.0] 100mM, EDTA 10mM, SDS al 1% (p/v) [1:1]) precalentado a 90 °C. La mezcla fue calentada adicionalmente durante un minuto a 90 °C y luego se sometió a vórtex durante cinco minutos. Las proteínas fueron extraídas añadiendo 250ul de cloroformo, alcohol isoamilico (24:1) y la mezcla fue sometida a vortex durante 5 minutos y centrifugado durante 15 minutos a 13,000rpm en una centrífuga Eppendorf 5414 a 4 °C. La capa acuosa fue eliminada y la extracción de la proteína se repitió dos veces más. Se añadió un volumen de LiCl 4mM y el ARN se dejó precipitar durante la noche a 4°C. Para recolectar el ARN, la mezcla fue centrifugada durante 15 minutos a 4 °C a 13,000rpm en una centrífuga de Eppendorf 5414. La pella fue resuspendida en agua en 250ul de agua estéril, desionizada. Para precipitar el ARN, se agregaron 0.1 volúmenes de solución de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y los volúmenes de etanol al 100%. Se tomó una alícuota y se centrifugo durante 20 minutos a 4 °C a 13,000rpm en una centrífuga de Eppendorf 5414. La pella fue lavada con 70% de etanol para remover las sales de la pella y se secó utilizando un vacío de velocidad. La pella fue resuspendida en 25ul de DEPC H<sub>2</sub>O y se analizó en cuanto a su integridad a través de electroforesis. El ARN fue almacenado a -70 °C.

RT-PCR y clonación del Arabidopsis AtPrPasa

Los cebadores de oligonucleótido sintéticos (MWG-Biotech) fueron diseñados con base en la secuencia de clones BAC (número de acceso al Gen-Bank AF007269, gen= "A\_IG002N01.21", complemento 24979...28076).

APP hacia adelante: 5' CCGTTAACAGCCATGGCGATTCTTTCATGGAA 3' (SEQ ID NO:15)  
APP reverso: 5' GTCCCGGGACTTAATCTGTCTTCTTGTCTT 3' (SEQ ID NO:16)

Los cebadores diseñados contenían un sitio HpaI en la región 5' y un sitio XmaI en la región 3' para propósitos de clonación.

La síntesis de la primera cadena de ADNc fue lograda utilizando AMV transcriptasa reversa (Roche, Mannheim, Alemania). La cadena de ADN sencilla resultante fue amplificada utilizando una reacción de polimerasa en cadena (PCR) utilizando los dos cebadores específicos del gen. Las condiciones para la reacción fueron condiciones estándar con el sistema Expand High Fidelity PCR (Roche). Los parámetros para la reacción fueron: 5 minutos a 94 °C seguidos por cinco ciclos de 40 segundos a 94 °C , 40 segundos a 50 °C y 1.5 minutos a 72 °C. Esto fue seguido por 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 65 °C y 1.5 a 72°C. El fragmento generado bajo estas condiciones RT-PCR tenía 1.3 kilobases de longitud.

El fragmento fue extraído con gel de agarosa con el kit de extracción QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y se ligó en el vector TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vectores recombinantes fueron transformados en células Top 10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Las células transformadas fueron seleccionadas sobre agar LB que contenía 100ug/ml de carbenicilina, 0.8mg X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 0.8mg IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) cultivados durante la noche a 37 °C. Las colonias blancas fueron seleccionadas y utilizadas para inocular 3ml de LB líquido que contenía 100ug/ml de ampicilina y crecieron durante la noche a 37 °C. Se extrajo el ADN plásmido utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante

La AtPrPasa-2 de arabidopsis clonada por RT-PCR fue secuenciada para obtener su secuencia de ADNc completa (SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO: 5).

**Ejemplo 6 – Complementación in vivo del mutante de levadura SM3614 (PrPasa)**

El fragmento que contenía el ADNc AtPrPasa de arabidopsis fue escindido del vector recombinante PCR2.1 TOPO por digestión con EcoRI (Roche) de acuerdo con las intrucciones de fabricantes. El fragmento subsecuente fue escindido del gel de agarosa con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAgen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ligado en el vector de expresión de levadura pYES2 (Invitrogen), luego escindido con EcoRI desfosforilado antes de la ligación.

El vector de expresión recombinante pYES2 contenía el ADNcAtPrPasa de arabidopsis en la orientación en sentido bajo el promotor de levadura GAL1 y fue transformado en el mutante de levadura SM3614 ( MATarcelΔ::TRP1 ste24D::LEU2) (Tam et al. 1998) siguiendo el protocolo de Invitrogen. Las células transformadas fueron seleccionadas para una Mezcla de Suplemento Completo (CSM) menos agar de uracilo al 0.8% (Bio 101, Inc.) cultivado a 30°C durante dos días. Las colonias transformadas fueron seleccionadas para hacer placas patrón que contenían parches del SM3614 transformado sobre placas CSM menos uracilo suplementadas con 2% de galactosa para inducción de la expresión del AtPrPasa de la arabidopsis. Las placas fueron cultivadas a 30°C durante dos

días. Las placas maestra fueron sembradas en replica sobre una cubierta de levadura tipo silvestre SM 1068 (MATxlisil) (Tam et al. 1998, TheJournal of CellBiology, 142, 635-649) sobre placas SD suplementadas con 2% galactosabajo diversas condiciones de coincidencia y se incubaron a 30°C durante dos días.

## 5 Ejemplo 7 – Clonación de ADNc de soja y maíz codificando para PrPasa

Construcción de bibliotecas de ADNc de sojas y maíz

10 Para aislar los clones que codifican la PrPasa a partir de sojas y maíz, crearon las bibliotecas de ADNc con SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. EL ARN total creado como se describe en el Ejemplo 5 fue utilizado como patrón. Se utilizaron hojas de maíz y tallos de hojas de soja de tres semanas de edad para la preparación del ARN total respectivamente.

15 Clonación de ADNc de sojas y maíz que codifica para PrPasa

Las secuencias EST para la ZmPrPasa y La GmPrPasa identificada a partir de la búsqueda en base de datos tal como se describe en el Ejemplo 4 se utilizaron para diseñar los oligos para RACE. Las secuencias parciales extendidas para la ZmPrPasa y GmPrPasa fueron obtenidas llevando a cabo la amplificación rápida de los extremos de ADN en la reacción de cadena de polimerasa (RACE PCR) utilizando el kit Advantage 2 PCR (Clontech Laboratories) y el kit de amplificación SMART RACE cDNA (Clontech Laboratories) utilizando un Biometra T3 Thermocycler siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos específicos para el gen (MWG-Bio- tech) usados fueron:

25 Para ZmPrPasa:

5' RACE oligo: 5' AGCAGCCACGATTGGTGGCCCAAT 3' (SEQ ID NO:21) 3' RACE oligo: 5' GGGCCACCAATCGTGGCTGCTATCA 3' (SEQ ID NO:22)

30 Para GmPrPasa:

5' RACE oligo: 5' CGCAGCCAGTCCTCATTGGGCTCATC 3' (SEQ ID NO:23) 3' RACE oligo: 5' CGGATAGTTGAGGGAGGAAGCAAG 3' (SEQ ID NO:24)

35 Las secuencias obtenidas a partir de la reacción RACE fueron compiladas para dar a las secuencias de nucleótidos para la GmPrPasa parcial (SEQ ID NO: 7) y ZmPrPasa (SEQ ID NO: 9).

## Ejemplo 8 – Diseño por manipulación de plantas de Arabidopsis resistentes a la sequía reduciendo la actividad del gen de PrPasa endógeno.

40 Construcción de vector binario: pGMSG ypGMGG.

El vector pLMNC53 (Mankin, 2000, PHD thesis) fue digerido con HindIII (Roche) y su extremo fue hecho romo con la enzima Klenow y dNTPs 0.1mM (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este fragmento fue extraído a partir de gel de agarosa con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado fue digerido entonces con EcoRI (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este fragmento fue extraído del gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento resultante de 1.4 kilobases, el castillo de gentamicina, incluía el promotor nos, el gen aaCl y el terminador g7.

50 El vector pBlueScript fue digerido con EcoRI y SmaI (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento resultante fue extraído del gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El vector digerido pBlueScript y los fragmento de casete de gentamicina fueron ligados con T4 ARN ligasa (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, uniendo los dos sitios respectivos EcoRI y uniendo el romo HindIII con el sitio SmaI.

55 El vector recombinante (pGMBS) fue transformado en células Top 10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Las células transformadas fueron seleccionadas sobre agar LB que contenía 100µg/ml de carbenicilina, 0.8mg X-gal (5-bromo-4-cloro-3- indolil-β-D-galactosido) y 0.8mg IPTG (isopropilto-β-D-galactosido), cultivados durante la noche a 37°C. Las colonias blancas fueron seleccionadas y utilizadas para inocular 3ml de LB líquido que contenía 100µg/ml de ampicilina y se cultivaron durante la noche a 37°C. El ADN de plasmido fue extraído utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los clones subsecuentes y el mapeo de restricción fue llevado a cabo utilizando técnicas de biología molecular estándar (Sambrook et al. 1989).

65 Tanto el vector pGMBS como el vector p1bxSuperGUS fueron digeridos en XbaI y KpnI (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, escindiendo el casete de gentamicina de pGMBS y produciendo el esqueleto del vector

p1bxSuperGUS. Los fragmentos resultantes fueron extraídos del gel de agarosa con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos fueron ligados con T4 ADN ligasa (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 El vector recombinante resultante (pGMSG) fue transformado en células Top 10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Las células transformadas fueron seleccionadas del agar LB que contenían 100µg/ml de carbenicilina, 0.8mg X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido) y 0.8mg IPTG (isopropiltio-β-D-galactosido), cultivados durante la noche a 37°C. Las colonias blancas fueron seleccionadas y utilizadas para inocular 3ml de LB líquido que contenía 100µg/ml de ampicilina y se cultivaron durante la noche a 37°C. El ADN de plásmido fue extraído utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los clones subsecuentes y el mapeo de restricciones fue llevado a cabo de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al. 1989).

15 Tanto el vector pBinK que contenía el promotor específico de células guardian KST1 (BerndMuller-Rober, 1999) y el vector pGMSG fueron digeridos con XbaI y SmaI de acuerdo con las instrucciones del fabricante, escindiendo el KST1 del pBinK y produciendo el esqueleto del pGMSG. Los fragmentos resultantes fueron extraídos del gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos fueron ligados con T4 ADN ligasa (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 El vector recombinante resultante (pGMGG) fue transformado en células Top 10 (Invitrogen) utilizando condiciones estándar. Las células transformadas fueron seleccionadas sobre un agar LB que contenía 100µg/ml de carbenicilina, 0.8mg X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido) y 0.8mg IPTG (isopropiltio-β-D-galactosido), cultivados durante la noche a 37°C. Las colonias blancas fueron seleccionadas y utilizadas para inocular 3ml de LB líquido que contenía 100µg/ml de ampicilina y se cultivaron durante la noche a 37°C. El ADN plásmido fue extraído utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis de los clones subsecuentes y el mapeo de restricción fueron llevados a cabo de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al. 1989).

30 Un ejemplo adicional del vector binario de plantas es el vector pBPS-GB1 en el cual se clonan candidatos del gen LMP. El vector binario contiene un gen de resistencia a la kanamicina dirigido bajo el control del promotor AtAct2-I y un promotor específico de semilla USP al frente del gen candidato con el terminador NOSpA. Se clona LMP ADNc parcial o de longitud completa en el sitio de clonación múltiple del vector binario de plantas en orientación sentido o antisentido tras el promotor específico de semilla USP. El vector recombinante que contiene el gen de interés se transforma en células Top 10 utilizando condiciones estándar. Las células transformadas se seleccionan sobre un agar LB que contiene 50µg/ml de canamicina cultivado durante la noche a 37°C. El ADN plásmido se extrae utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los clones subsecuentes y el mapeo de restricción se lleva a cabo utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

40 Subclonación de la AtPrPasa de Arabidopsis en los vectores binarios.

El fragmento que contenía el PPasa ADNc de Arabidopsis fue escindido del vector PCR2.1 TOPO recombinante por digestión con XpaI y XmaI (Roche) de acuerdo con las instrucciones de fabricantes. El fragmento de subsecuencia fue escindido del gel de agarosa con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ligado en los vectores binarios pGMSG y pGMGG, escindido con XmaI y Ecl1366II desfosforilado antes de la ligación y ligado en un vector binario con el promotor pBPDGB01 de USP, escindido con AsCI y PacI antes de la ligación, respectivamente. Los vectores recombinantes pGMSG y pGMGG contenían la prenilproteasa de Arabidopsis en la orientación antisentido bajo el superpromotor constitutivo y el promotor específico KST1 de celula-guardian. El vector pBPSGB01 contenía el ADN PPasa de Arabidopsis en orientación sentido y antisentido bajo el control del promotor específico de semilla USP.

#### Transformación de Agrobacterium

55 Los vectores recombinantes fueron transformados en C58C1 y PMP90 de Agrobacterium tumefaciens de acuerdo con condiciones estándar (Hoefgen and Willmitzer, 1990).

#### Transformación de Plantas.

60 Los ecotipos C24 y Col-2 de Arabidopsis thaliana fueron cultivados y transformados de acuerdo con condiciones estándar (Bechtold 1993, AcadSci.Paris. 316:1194-1199, Bent et al. 1994, Science 265:1856-1860).

#### Selección de Plantas Transformadas

65 Las semillas fueron esterilizadas de acuerdo con protocolos estándar (Xiong et al. 1999, Plant Molecular Biology Reporter 17:159-170). Las semillas fueron sembradas sobre agar ½ MS 0.6% 1-3% de sacarosa y 51 150Pg/ml de

gentamicina. Las semillas sobre las placas fueron vernalizadas durante dos días a 4 °C. Las semillas germinaron en una cámara climática a una temperatura de aire de 22 °C y la intensidad lumínica de 55 micromol<sup>-1</sup>m<sup>2</sup> (luz blanca; tubo fluorescente Philips TL 65W/25) y luz durante 24 horas. Las germinaciones transformadas fueron seleccionadas después de 7-14 días y transferidas a placas de agar ½ MS 0.6% suplementadas con 1% de sacarosa y se dejaron en recuperación durante 1-5 días.

#### Selección de la Tolerancia a la Sequía

Las plantas transgénicas se seleccionan por su tolerancia mejorada a la sequía de acuerdo con el método de selección descrito (las germinaciones son transferidas a papel de filtro estéril seco, y se dejan secar durante 4 horas. Luego los germinados son retirados y colocados en placas de agar ½ MS 0.6% y almacenadas después de dos días.

#### Selección de Tolerancia a la Sal

Las plantas transgénicas se seleccionan en cuanto a la tolerancia mejorada a la sal de acuerdo con el método de selección descrito (los germinados son transferidos a ½ MS líquido suplementado con NaCl 600mM y se dejan incubar durante 2-4 horas. Los germinados se retiran y se colocan entonces sobre placas de agar ½ MS 0.6% y se almacenan y se hace un recuento de germinados sobrevivientes después dos días).

#### Selección de Compuestos de Almacenamiento en Semillas.

Las semillas T2 y T3 de las plantas transgénicas se seleccionan en cuanto a las cantidades incrementadas de compuestos de almacenamiento en semillas (aceite, azúcares, proteína) de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 34 (véase más abajo).

#### **Ejemplo 9 - Producción por manipulación de plantas de soja tolerantes a la sequía por reducción de la actividad del gen endógeno GmPrPasa.**

El clon de GmPrPasa (SEQ ID NO:7) fue clonado en los vectores pGMSG y pGMGG en orientación antisentido. Estos constructos fueron utilizados para transformar la soja como se describe más abajo.

Se esteriliza la superficie de semillas de soja con etanol a 70% durante cuatro minutos a temperatura ambiente con agitación constante, seguido por Clorox al 20% (v/v) suplementado con 0.05% (v/v) de Tween durante 20 minutos con agitación continua. Luego las semillas se juagan cuatro veces con agua destilada y se colocan sobre un papel de filtro estéril húmedo en una caja de Petri a temperatura ambiente durante 6 a 39 horas. Los recubrimientos de las semillas se retiran y se desprenden los cotiledones del eje del embrión. El eje del embrión se examina para asegurarse de que la región meristemática no se ha dañado. Los escindidos del embrión se recogen en una caja de Petri estéril de mitad abierta y se secan hasta tener un contenido de humedad menor del 20% (peso fresco) en una caja de Petri sellada hasta su uso posterior.

El cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se prepara a partir de una colonia individual en medio LB sólido más antibióticos apropiados (por ejemplo, 100 mg/l de streptomycin, 50 mg/l de kanamicina) seguido por cultivo de la colonia individual en medio LB hasta una densidad óptica a 600nm de 0.8. Luego, el cultivo bacteriano se forma en pella a 7000rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, si se resuspende en medio MS Murashige y Skoog, 1962) 100 uM de acetosiringona. Los cultivos bacterianos son incubados en este medio de preinducción durante 2 horas a temperatura ambiente antes de su uso. El eje de los embriones de las semillas zigóticas de soja a aproximadamente 15% de contenido de humedad son imbibidos durante 2 horas a temperatura ambiente con el cultivo de suspensión de *Agrobacterium* preinducido. Los embriones son retirados del cultivo de inhibición y son transferidos a cajas de Petri que contienen medio MS sólido suplementado con 2% de sacarosa que incubados durante 2 días en la oscuridad a temperatura ambiente. Alternativamente, los embriones son colocados sobre papel de filtro estéril humedecido (medio MS líquido) en una caja de Petri e incubados bajo las mismas condiciones descritas más arriba. Después de este periodo, los embriones son transferidos al medio MS bien sea sólido o líquido suplementado con 500 mg/L de carbenicilina o 300 mg/L de cefotaxima para matar las agrobacterias. El medio líquido se utiliza para humectar el papel de filtro estéril. Los embriones son incubados durante 4 semanas a 25 °C, bajo 150 umol m<sup>-2</sup> segundo<sup>-1</sup> y 12 horas de fotoperíodo. Una vez que los germinados han producido raíces se prefieren a un suelo metromix. El medio de las plantas in vitro es eliminado por lavado antes de transferir las plantas al suelo. Las plantas se mantienen bajo una cubierta plástica durante una semana para favorecer el proceso de aclimatación. Luego las plantas son transferidas a un recinto de crecimiento donde se incuban a 25 °C bajo 150umol m<sup>-2</sup>segundo<sup>-1</sup> y 12 horas de fotoperíodo durante aproximadamente 80 días.

Las plantas transgénicas son seleccionadas en cuanto a su tolerancia mejorada a la sequedad de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia a la sequedad.

#### **Ejemplo 10 – Obtencion por manipulación de plantas de colza tolerantes a la sequedad por reducción a la actividad del gen PrPasa endógeno con el clon AtPrPasal.**

Los constructos pBPSRC003 y pBPSRC005 fueron utilizados para transformar las colza como se describe más abajo.

5 El método de la transformación de plantas descrito en el Ejemplo 8 también es aplicable a la Brassica y otros cultivos. Las semillas de canola son esterilizadas en superficie con etanol al 70% durante cuatro minutos a temperatura ambiente con agitación continua, seguida por Clorox al 20% (v/v) suplementado con Tween al 0.05% (v/v) durante 20 minutos, a temperatura ambiente con agitación continua. Luego, las semillas son enjuagadas cuatro veces con agua destilada y se colocan en papel de filtro estéril humedificado en una placa de Petri a temperatura ambiente durante 18 horas. Luego los recubrimientos de las semillas se retiran y las semillas se secan con aire durante la noche en una caja de Petri esteril abierta a la mitad. Durante este periodo las semillas pierden aproximadamente 85% de su contenido de agua. Las semillas se almacenan entonces a temperatura ambiente en una caja de petri sellada hasta su uso. Los constructos de ADN y las inhibiciones de los embriones son tal como se describieron en el Ejemplo 8. Se analizan muestras de las plantas transgénicas primarias (T0) por PCR para confirmar la presencia de ADN T. Estos resultados se confirman por hibridación Southern en la cual se somete el ADN a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y se transforma en una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics). Se utiliza el kit PCR DIG ProbeSynthesis (Roche Diagnostics) para preparar una sonda marcada con digoxigenina por PCR, y utilizada como lo recomienda el fabricante.

20 Las plantas transgénicas son seleccionadas en cuanto a su tolerancia mejorada a la sequedad de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia a la sequía.

#### 25 **Ejemplo 11 – Plantas de maíz obtenidas por manipulación tolerantes a la sequía reduciendo la actividad del gen ZmPrPasaendogeno**

El clon GmPrPasa (SEQ ID NO:9) fue clonado en los vectores pGMSG y pGMGG en orientación antisentido. Estos constructos fueron utilizados para transformar el maíz como se describe más abajo.

30 La inhibición de los embriones secos con un cultivo de Agrobacterium también es aplicable a los ejes de embriones de maíz. El protocolo experimental es el mismo que se describe en el Ejemplo 8 pero utilizando semillas de maíz como fuente de embriones.

35 Las plantas transgénicas se seleccionan en cuanto a su tolerancia mejorada a la sequía de acuerdo con el método de selección descrito en el Ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia a la sequedad.

#### 35 **Ejemplo 12 – Expresión específica de células guardianes del promotor AtPrPasa**

40 La región promotora de AtPrPasa (SEQ ID NO: 11) fue clonada en pGMSG en lugar del superpromotor, que guía el gen informador GUS (Jefferson et al., 1987). El constructo resultante pBPSRC006 fue transformado en plantas de Arabidopsis tal como se describe en el Ejemplo 7.

Las plantas transgénicas se seleccionan en cuanto a su tinción específica de células guardianes demostrando que la expresión transgénica confiere actividad promotora específica para células guardianes.

#### 45 **Ejemplo 13 – Sobreexpresión de PrPasa en plantas que lleva a tolerancia incrementada al estrés y crecimiento de las plantas.**

50 Los clones AtPrPasa1 (SEQ ID NO:3), AtPrPasa2 (SEQ ID NO: 5) fueron clonados en los vectores PMSG en orientación sentido. Estos constructos fueron utilizados para transformar Arabidopsis, soja, colza y maíz tal como se describe en los Ejemplos 7, 8, 9 y 10 respectivamente.

Las plantas transgénicas son seleccionadas en cuanto a su tolerancia mejorada al estrés de acuerdo con el método de selección descrito en el ejemplo 7 demostrando que la expresión transgénica confiere tolerancia al estrés.

55 Las plantas transgénicas fueron seleccionadas adicionalmente en cuanto a su tasa de crecimiento demostrando que la expresión transgénica confiere tasas de crecimiento mejoradas.

#### 60 **Ejemplo 14 - Aislamiento de un clon específico de la muestra depositada**

60 El material depositado en la muestra asignada al número de depósito ATCC citado en la Tabla 1 para cualquiera de los clones ADNc también puede uno o más plásmidos adicionales, comprendiendo cada uno clon de ADNc diferente del clon dado. Así, los depósitos que comparten el mismo número de depósito ATCC contienen al menos un plásmido para clon de ADNc identificado en Tabla 1. Típicamente, cada muestra de depósito en ATCC citado en la Tabla 1 comprende una mezcla de aproximadamente cantidades iguales (por peso) de aproximadamente 1-10 plásmidos de ADN, conteniendo cada uno un clon diferente de ADNc y/o un clon parcial de ADNc; pero tal muestra de depósito también puede incluir plásmidos para más o menos de 2 clones de ADNc.

Pueden usarse dos metodologías para aislar un clon particular a partir de la muestra depositada de los ADN plásmidos citadas para ese clon en la Tabla 1. Primero, un plásmido se aísla directamente seleccionando los clones utilizando una sonda de polinucleótidos correspondiente a SEQ ID NO: X.

5 En particular, se sintetiza un polinucleótido específico con 30 -40 nucleótidos utilizando un sintetizador de ADN Applied Biosystems de acuerdo con la secuencia reportada. El oligonucleótido es marcado, por ejemplo, con polinucleótido kinasa 32P-(-ATP) utilizando T4 y purificado de acuerdo con los métodos de rutina (por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). La mezcla de plásmidos se transforma en un huésped adecuado, tal como se indica más arriba (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) utilizando técnicas conocidas para los expertos en la técnica, tales como las provistas por el proveedor del vector o en publicaciones o patentes relacionadas citadas más arriba. Los transformante se siembran en placa sobre placas de agar 1.5% (que contienen el agente de selección apropiado, por ejemplo, ampicilina) hasta una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Estas placas se seleccionan utilizando membranas de nylon de acuerdo con métodos de rutina para la selección de colonias bacterianas (e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edit., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pages 1.93 to 1.104), u otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

20 Alternativamente, dos cebadores de nucleótidos 17 -20 derivados de ambos extremos de SEQ ID NO:X (esto es, dentro de la región de SEQ ID NO:X unida por el 5' NT y el 3' NT del clon definido en la Tabla 1) se sintetizan y usan para amplificar el ADNc deseado utilizando el plásmido ADNc como patrón. La reacción en cadena en polimerasa se lleva a cabo condiciones de rutina, por ejemplo, en 25 ul de mezcla de reacción con 0.5 ug del patrón de ADNc anterior. Una mezcla de reacción conveniente es MgCl<sub>2</sub> 1.5-5 mM gelatina al 0.01% (p/v), 20um de cada de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol de cada cebador y 0.25 unidades de Taq polimerasa. Se ejecutan 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto; anillacion a 55 °C durante 1 minuto; elongación 72 °C durante 1 minuto) con un ciclizador térmico automático Perkin-Elmer Cetus. El producto amplificado se analiza por electroforesis sobre gel de agarosa y la banda de ADN con peso molecular esperado se escinde y purifica. Se verifica que el producto de PCR sea la secuencia seleccionada subclonando y secuenciando el producto de ADN.

30 Hay disponibles diversos barrios para la identificación de las porciones 5' o 3' no codificantes y/o codificantes de un gen que podrían no estar presentes en el clon depositado. Estos métodos incluyen pero no se limitan a, sonda de filtro, enriquecimiento del clon utilizando sondas específicas, y protocolos similares o idénticos a los protocolos "RACE" de 5' y 3' que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método similar a 5' RACE está disponible para generar el extremo faltante 5' de un transcripto de longitud completa (Fromont-Racine et al., *Nucleic Acids Res.* 21(7):1683-1684 (1993)).

35 Brevemente, un oligonucleótido de ARN específico es llegado a los extremos 5' de una población de ARN que contiene presumiblemente los transcriptos del gen de ARN de longitud completa. Un primer conjunto que contiene un cebador específico a los oligonucleótidos de ARN ligados y un cebador específico a una secuencia conocida del gen de interés se utiliza para amplificar por PCR la porción 5' del gen de longitud completa deseado. Éste producto amplificado puede ser luego secuenciado y utilizado para generar el gen de longitud completa.

40 Este método antes mencionados se inicia con el ARN total aislado de la fuente deseada, aun que puede usarse poli-A+ARN. La preparación del ARN puede tratarse con fosfatasa si es necesario para eliminar los grupos fosfato 5' sobre el ARN degradado o dañado que puedan interferir con la posterior etapa de ARN ligasa. La fosfatasa debería ser entonces inactiva y el ARN ha tratado con ácido perifosfatasa de tabaco con el fin de eliminar la estructura de cubierta presenta los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo 5' fosfato en el extremo 5' del ARN escindido con cubierta que puede luego ser ligado a un oligonucleótido de ARN utilizando T4 ARN ligasa.

45 La preparación de ARN modificada se utiliza como un molde para la síntesis de una primera cadena de ADNc utilizando un oligonucleótido específico del gen. La primera reacción de síntesis de cadena se utiliza como patrón para la amplificación por PCR del extremo 5' deseado utilizando un cebador específico para el oligonucleótido del ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen de interés. El producto resultante luego se consecuencia y se analiza para confirmar que la secuencia terminal 5' corresponde al gen deseado. Adicionalmente, puede ser ventajoso optimizar el protocolo de RACE para incrementar la probabilidad de aislar la codificación 5' o 3' adicional o consecuencias no codificadoras. Se conocen diversos métodos para optimizar el protocolo de RACE en la técnica, aunque puede encontrarse una descripción detallada que resume estos métodos en B.C. Schaefer, *Anal. Biochem.*, 227:255-273, (1995).

#### **Ejemplo 15 - Distribución de en tejidos de los polipéptidos.**

60 La distribución de los tejidos de ARNm de los polinucleótidos de la presente invención se determinó utilizando protocolos para el análisis Northern blot, descrito por, entre otros, Sambrook et al. Por ejemplo, una sonda de ADNc producida por el método descrito en el Ejemplo 1 se marca con p32 utilizando el sistema de marcación de ADN rediprimetm (Amersham Life Scinece), de acuerdo con las instrucciones del fabricant. Después de la marcación, la sonda es purificada utilizando una columna CHROMA SPIN0-100 (Clontech Laboratories, Inc.) de acuerdo con un protocolo del fabricante número número PT1200-1. La sonda marcada purificada se utiliza entonces para examinar diversos tejidos para la expresión del ARN.

Las placas de Northern blot de tejidos que contienen los ARNm enlazados de los diversos tejidos se examinan con la sonda marcada utilizando la solución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech de acuerdo con el número de protocolo del fabricante PT1190-1. Los Northern blot pueden ser producidos utilizando diversos protocolos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook et al). Después de la hibridación y lavado, los blots son montados y expuestos a una película a -70 °C durante la noche, y las películas se desarrollan de acuerdo con procedimientos estándar.

#### **Ejemplo 16 – Mapeo cromosómico de los polinucleótidos.**

Un primer conjunto de oligonucleótido se diseña de acuerdo con la secuencia en el extremo 5' de SEQ ID NO: X. Este iniciador barre preferiblemente aproximadamente 100 nucleótidos. Este conjunto de iniciadores se utiliza entonces en una reacción en cadena de polimerasa bajo las siguientes condiciones: 30 segundos, 95 °C; 1 minuto, 56 °C; 1 minuto, 70 °C. Este ciclo se repite 32 veces seguido por un ciclo de 5 minutos a 70 °C. El ADN de planta se utiliza como patrón además de un panel híbrido de células somáticas que contienen cromosomas individuales fragmentos de cromosomas (Bios, Inc). Las reacciones se analizan bien sea sobre rieles de poliacrilamida al 8% o geles de agarosa al 3.5%. El mapeo de cromosomas se determina por la presencia de un fragmento de PCR de aproximadamente 100 bp en el híbrido celular somático particular.

#### **Ejemplo 17 – Expresión bacteriana de un polipéptido.**

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se amplifica utilizando cebadores de oligonucleótidos de PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, tal como se dibuja en el Ejemplo 1, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores utilizados para amplificar el inserto de ADNc contienen preferiblemente sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI, en el extremo 5' de los cebadores con el fin de clonar el producto amplificado el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de restricción enzimática sobre el vector de expresión bacteriano pQE-9 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). El vector de plásmido codifica la resistencia a los antibióticos (Ampr), un origen bacteriano de la replicación (ori), un promotor/operador regulable por IPTG (P/O), un sitio enlazamiento de ribosomas (RBS), un marcador de 6-histidina (6-His), y sitios de clonación de restricción enzimática.

El vector pQE-9 es digerido con BamHI y XbaI y el fragmento amplificado se liga al vector pQE-9 manteniendo el marco de lectura iniciada en el RBS bacteriano. La mezcla de ligación se utiliza entonces para transformar la cepa de *E. coli* M15/rep4 (Qiagen, Inc) que contiene copias múltiples del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a la kanamicina (Kanr). Los transformantes son identificados por su capacidad para crecer sobre placas de LB y se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. El ADN de plásmido se aísla y se confirma por análisis de restricción.

Los clones que contienen los constructos designados se cultivan durante la noche (O/N) en un cultivo líquido en medio de LB suplementa Amp (100 ug/ml) y Kan (25 ug/ml). El cultivo ON se utiliza para inocular un gran cultivo a una proporción de 1:100 hasta 1:250. Las células se hacen crecer hasta una densidad óptica 600 (O.D. 600) de entre 0.4 y 0.6. Se añade entonces IPTG (Isopropil-B-D-tiogalacto piranosido) hasta una concentración final de 1mM. El IPTG induce por inactivación del represor lacI, la limpieza del P/O que lleva a una expresión genética incrementada.

Las células se hacen crecer durante 3 o 4 horas más. Luego las células se recolectan por centrifugación (20 minutos a 6000Xg). La pella de célula se solubiliza en una gente caotropico guanidina 6 molar HCL por agitación durante 3-4 horas a 4 °C. Los residuos celulares se eliminan por centrifugación y sobrenadante que contiene el polipéptido se carga sobre una columna de resina por afinidad de níquel –nitrilo- ácido triasetico ("Ni-NTA) (disponible en QIAGEN, Inc., supra). Las células con un marcador 6 x His se enlazan a la resina Ni-NTA con alta afinidad y pueden purificarse en un procedimiento sencillo de una etapa (para detalles véase: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., supra).

Rápidamente, el sobrenadante es cargado sobre la columna en guanidina – HCL 6 M, pH 8, las columnas en la primera con 10 volúmenes de guanidina – HCL 6 M, pH 8, luego se lava con 10 volúmenes de guanidina – HCL 6 M, pH 6, y finalmente el polipéptidos eludido con guanidina – HCL 6 M, pH 5.

La proteína purificada se renaturaliza luego por diálisis contra una solución salina regulada con fosfato (PBS) o acetato de sodio 50mM, regulador de pH 6 más NaCl 200 mM . Alternativamente, la proteína puede ser replegada exitosamente mientras se inmoviliza sobre la columna de Ni-NTA. Las condiciones recomendadas son como sigue: renaturalizar utilizando un gradiente de urea lineal 6M -1M en NaCl 500mM, glicerol al 20%, Tris/HCL 20mM pH 7.4, que contienen los inhibidores de proteasa. La renaturalización debería llevarse a cabo durante un período de 1.5 horas o más. Después de la renaturalización las proteínas se eluyen por la adición de 250 mM de imidazol. El imidazol se elimina mediante una etapa de diálisis final contra PBS o un regulador de acetato de sodio 50 mM pH 6 más NaCl 200 mM. La proteína purificada se almacena a 4 °C o se congela al -80 °C.

**Ejemplo 18-purificación de un polipéptido a partir de un cuerpo de inclusión.**

El siguiente método alternativo puede utilizarse para purificar un polipéptido expresada E. coli cuando está presente en la forma de cuerpos de inclusión.

5 A menos que se especifique otra cosa todas las siguientes etapas se llevan a cabo a 4-10°C. Al terminar la fase de producción de la fermentación de E. coli, el cultivo celular se enfría a 4-10°C y las células se recolectan por centrifugación continua a 15000rpm (Heraeus Sepatech). Sobre la base de un rendimiento esperado de proteína por unidad de peso de la pasta de células y de la cantidad de proteína purificada requerida, se suspende una cantidad apropiada de pasta de células, por peso, en una solución reguladora que contiene Tris 100 mM, BDTA 50 mM, pH 7.4. Las células se dispersan hasta una suspensión homogénea utilizando un mezclador de alta rotación. Las células se someten a lisis entonces pasando la solución a través de un microfluidizador (Microfluidics, Corp. or APV Gaulin, Inc.) doble at 4000-6000 psi. El homogenizado se mezcla entonces con una solución de NaCl hasta una concentración final de 0.5M de NaCl, seguido por centrifugación a 7000 xg durante 15 minutos. La peya resultante se lava de nuevo utilizando NaCl a 0.5M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7.4.

15 Los cuerpos de inclusión resultantes lavados se solubilizan con clorhidrato de guanidina 1.5M (GuHCL) durante 2-4 horas. Después de centrifugación a 7000g durante 15 minutos, se descarta la peya y el sobrenadante que contiene el polipéptido se incubaba a 4°C durante la noche para permitir una extracción adicional de GuHCL.

20 Después de centrifugación a alta velocidad (30000 xg) para eliminar partículas insolubles, la proteína solubilizada GuLlCL se repliega mezclando rápidamente el extracto de GUHCL con 20 volúmenes de regulador que contiene solución 5000mM, pH 4, NaCl 50mM, EDTA 2mM por agitación vigorosa. La solución de proteína diluida replegada se mantiene a 4°C sin mezclado durante 12 horas antes de las siguientes etapas de purificación.

25 Para clarificar la solución de polipéptido replegada, se emplea una unidad de filtración tangencial preparada previamente equipada con un filtro de membrana de 0.16µm con área superficial apropiada (por ejemplo, filtrón) equilibrada con acetato de sodio 40mM, pH 6.0. La muestra filtrada se localiza sobre una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, Poros HS-50, Perseptive Biosystems). La columna se lava con acetato de sodio 40mM, pH 6.0 y se diluye con NaCl 250mM, 500mM, 1000mM y 1500mM en el mismo regulador, paso a paso. Se monitorea de forma continua la absorbancia a 280nm del efluente. Se recogen las fracciones y se analizan posteriormente por SDS-PAGE

35 Se reúnen entonces las fracciones que contienen el polipéptido y se mezclan con 4 volúmenes de agua. La muestra diluida se carga entonces sobre un conjunto previamente preparado de columnas de resinas de intercambio aniónico fuerte (Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) y aniónica débil (Poros CM-20, 4:37). Las columnas se equilibran con acetato de sodio 40mM, pH 6.0. Ambas columnas son lavadas con acetato de sodio a 40mM, pH 6.0, NaCl 200mM. La columna CM-20 se diluye utilizando entonces un gradiente lineal de 10 veces el volumen de la columna que varía desde 0.2M NaCl, acetato de sodio 50mM, pH 6.0 hasta NaCl 1.0M, acetato de sodio 50mM, pH 5.0. Las fracciones se recolectan bajo monitoreo constante A280 del efluente. Las fracciones que contienen el polipéptido (determinado, por ejemplo, SDS-PAGE al 16%). El polipéptido resultante debería exhibir más de 95% de pureza después del repliegue y de las etapas de purificación. No deberían observarse bandas contaminantes principales del gel de SDS-PAGE al 16% teñido con azul de Commassie cuando se cargan 5µg de proteína purificada. La proteína purificada también puede probarse en cuanto a contaminación con endotoxina/LPS, y típicamente el contenido de LPS es menor de 0.1ng/ml de acuerdo con las pruebas LAL.

#### 45 **Ejemplo 19-clonación expresión de un polipéptido en un sistema de expresión de baculovirus**

En este ejemplo, contiene el vector disparador de plásmido pAc373 se utiliza para sintetizar un nucleótido en un baculovirus para expresar un polipéptido. Un vector de expresión de un baculovirus típico contiene el promotor de polihedrina fuerte del virus de polihedrosis nuclear de autógrafa californica (AcMNPV) seguidos por sitios de restricción convenientes, que pueden incluir, por ejemplo, BamHI, Xba I y Asp718. El sitio de poliadenilación del virus de simio 40 ("SV40") se utiliza frecuentemente para una poliadenilación eficiente. Para una selección fácil del virus recombinante, el plásmido contiene el gen de beta-galactosidasa de E. coli bajo control de un promotor débil de Drosophila en la misma orientación, seguido por la señal de poliadenilación del den polihedrina. Los genes insertados son flanqueados en ambos lados por secuencias virales para una recombinación homóloga mediada por las células con ADN viral tipo silvestre para generar un virus viable que exprese el polinucleótido clonado.

55 Pueden usarse muchos otros vectores de baculovirus en lugar del vector anterior, tales como pVL941 y pAcIM1, tal como podría apreciarlo fácilmente una persona experimentada en la técnica, en cuanto al constructo proporciona aproximadamente señales localizadas para la transcripción, traducción, secreción y similares incluyendo a una señal peptídica en un marco AUG tal como se requiere. Tales vectores se describen, por ejemplo, en Luckow et al., Virology 170:31-39 (1989).

60 Un polinucleótido que codifica a un polipéptido de la presente invención se amplifica utilizando cebadores de oligonucleótidos de PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, tal como se delinea en el Ejemplo 1, para sintetizar los fragmentos de inserción. Los cebadores utilizados para amplificar el inserto ADNc deberían contener preferiblemente sitios de restricción en el extremo 5' de los cebadores con el fin de clonar el producto amplificado del vector expresión. Específicamente, la secuencia de ADN contenida en el clon depositado

incluyendo la iniciación AUG, el codón y la secuencia guía asociada de forma natural identificada en el presente documento (si es aplicable), se amplifica utilizando el protocolo de PCR descrito en el Ejemplo 1. Si la secuencia de señal de origen natural se utiliza para producir la proteína, el vector no necesita un segundo péptido de señalización. Alternativamente, el vector puede ser modificado para incluir una secuencia de guía del baculovirus, utilizando métodos estándares descritos Summers et al., "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures," Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987)

El fragmento amplificado se aísla a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando un kit comercialmente disponible ("GeneClean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digiere entonces con enzimas de restricción apropiadas y se purifica de nuevo sobre un gel de agarosa al 1%. El plásmido es digerido con las correspondientes enzimas de restricción y opcionalmente, puede ser desfosforilado utilizando fosfatasa intestinal de ternera, usando procedimientos de rutina utilizados en la técnica. Luego el ADN se aísla a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando un kit comercialmente disponible ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

El fragmento y el plásmido es desfosforilado se ligan entre sí con la T4 ADN ligasa. Células de E. coli HB101 u otros huéspedes de E. coli adecuados tales como XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Case transforman con la mezcla de ligación y se esparcen sobre placas de cultivo. Las bacterias que contienen los plásmidos se identifican digiriendo el ADN de las colonias individuales y analizando el producto de digestión por electroforesis en gel. La secuencia de los fragmentos clonados se confirma por secuenciamiento de ADN

Se transforman 5µg de un plásmido que contiene el polinucleótido con 1.0µg de un ADN de baculovirus linealizado disponible comercialmente ("BaculoGoldtm baculovirus. DNA", Pharmingen, San Diego, CA), utilizando el método de lipofección descrito por Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-74417 (1987). Se mezclan 1µg de AND de virus BaculoGoldtm y 5µg del plásmido en un pozo in al estéril de una placa de microtitulación que contiene 50µl de medio de Grace's libre de suero (Life Technologists Inc., Gaithersburg, MD). Después de ello, se agregan 10µl de lipofectina más 90µl de medio de Grace, se mezclan y se incuban por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla de tranfección se añade gota a gota a células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de tejidos de 35mm con 1ml del suero de Grace sin suero. La placa luego se incuba 5 horas a 27°C. La solución de tranfección se retira entonces de la placa y se agrega 1ml de medio para insectos de Grace suplementado con 10% de suero fetal de ternera. El cultivo se continúa entonces a 27°C durante cuatro días.

Después de cuatro días el sobrenadante se recolecta y se lleva a cabo una placa de ensayo, tal como lo describe en Summers and Smith, supra. Se utiliza un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) para permitir una identificación y aislamiento fácil de los clones que expresan que expresan GAI, lo que producen placas teñidas de azul. (Una descripción detallada de "prueba de placas" de este tipo pueden encontrarse también en la guía para usuario del cultivo de células de insectos y de baculovirología distribuido por Life Technologies Inc., Gaithersburg, page 9-10.). Después de una incubación apropiada, las placas teñidas de azul se pican con la punta de un micropipeteador (por ejemplo, eppendorf). El agar que contiene los virus recombinantes se resuspenden entonces en un tubo de microcentrifuga que contiene 200µl del medio de Grace y la suspensión que contiene el baculovirus recombinante se usa para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35mm. Cuatro días después los sobrenadantes de estas placas de cultivos se recolectan y luego se almacenan a 4°C.

Para verificar la expresión del polipéptido, se cultivan células Sf9 en medio de Grace suplementada con 10% de FBS inactivado por calor. Las células se infectan con el baculovirus recombinante que contienen el polinucleótido de una multiplicidad de infecciones ("MOI") de aproximadamente 2. Si se desean proteínas radiomarcadas, 6 horas después se retira el medio y se reemplaza con medio SF900 II menos metionina y cisteína (disponible en Life Technologies Inc., Rockville, MD). Después de 42 horas, se agregan 5µCi de 35S-metionina y 5µCi de 35S-cisteína (disponible de Amersham). Las células se incuban adicionalmente durante 16 horas y luego se recolectan por centrifugación. La proteína en el sobrenadante así como las proteínas intracelulares se analizan por SDS-PAGE seguida de autorradiografía (si están radiomarcadas).

El microsecuenciamiento de la secuencia de aminoácidos del término amino de la proteína purificada puede utilizarse para determinar la secuencia amino terminal de la proteína producida.

#### **Ejemplo 20- Expresión de un polipéptido en células de mamíferos,**

El polipéptido de la presente invención puede expresarse en una célula de mamífero. Un vector de expresión típico en mamíferos contiene un elemento promotor, el cual media en la iniciación de la transcripción del ARNm, una secuencia de codificación de proteína, y señales requeridas para la terminación de la transcripción de la poliadenilación del transcrito. Elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias que intervienen flanqueadas por sitios donantes y aceptadores para acoplamiento de ARN. Una transcripción altamente eficiente se alcanza con los promotores temprano y tardío del SV40, las repeticiones terminaciones largas (LTRs) de reovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden utilizarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humana).

Los vectores de expresión adecuado para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pibiSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146),

pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0, y pCMVSPORT 3.0. Las células huésped de mamíferos que podrían utilizarse incluyen, células humanas HeLa, 293, H9 y Jurkat, células de ratón NIH3T3 and C127, Cos I, Cos 7 y CV1, células de codorniz QC1-3, células de ratón L y células de ovario de hámster chino (CHO).

5 Alternativamente, el polipéptido puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido integrado en un cromosoma. La co-transformación con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transformadas.

10 El gen transformado también puede ser amplificado para expresar grandes cantidades de la proteína codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil en el desarrollo de líneas celulares que portan varios cientos o varios miles de copias del gen de interés (Veáse, por ejemplo, Alt, F. W., et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); Hamlin, J. L. and Ma, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990); Page, M. J. and Sydenham, M. A., Biotechnology 9:64-68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Usando estos marcadores, las células se cultivan en medios selectivos y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas celulares contienen el gen amplificado integrado a un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO se utilizan frecuentemente para la producción de proteínas.

20 Un polinucleótido de la presente invención es amplificado de acuerdo con protocolo delineado en el Ejemplo 1. Si la secuencia de señalización de presencia natural se utiliza para producir la proteína, el vector no necesita un segundo péptido de señalización. Alternativamente, si no se utiliza la secuencia de señalización que se presenta de forma natural, el vector puede modificarse para incluir una secuencia de señalización heteróloga (Vease, por ejemplo, WO 96/34891). El fragmento amplificado se aísla a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando un kit disponible comercialmente ("GeneClean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento luego se digiere con enzimas de restricción apropiadas y se epurifica de nuevo en un gel de agarosa al 1%.

25 El fragmento amplificado se digiere entonces con la misma enzima de restricción y se purifica sobre un gel de agarosa al 1%. El fragmento aislado y el vector defosforilado se ligan entonces con T4 ADN ligasa. Se transforman células de E.coli HB101 o XL-1 Blue y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmico pC6 utilizando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

30 Las células de ovario de hámster chino que carecen del gen DHFR activo se utilizan para la transformación. Se cotransforman 5µg de un plásmido de expresión con 0.5µg del plásmido pSVneo utilizando lipofectina (Felgner et al., supra). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo del Tn5 que codifica una enzima que confiere la resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo el G418. Las células se siembran sobre un MEM alfa menos suplementado con 1 mg/ml G418. Después de 2 días, las células se tripsinizan y se siembran sobre placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en MEM alfa menos suplementado con 10, 25, o 50 ng/ml de metotrexato más 1 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 10 a 14 días los clones individuales son tripsinizados y luego se siembran en placas de Petri o en frascos de 10ml utilizando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren entonces a nuevas placas de 6 pozos que contienen concentraciones aún más altas de metotrexato

40 (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM). El mismo procedimiento se repite hasta que se tengan clones que crezcan a una concentración de 100 - 200 µM. La expresión del producto genético deseado se analiza, por ejemplo, por SDS-PAGE y Western blot o por análisis de HPLC en fase reversa. Además del método provisto anteriormente, en la técnica se conocen otros métodos de expresión de polipéptidos, preferiblemente polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6,066,781 (la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad), describe un gen quimérico que consiste de los polinucleótidos codificantes para la unidad estructural N-terminal que corresponden a una porción del péptido de secuencia de señalización para el arroz de alfa-amilasa (MKNTSSLCLLLLVLCSLTCNSGQA (SEQ ID NO:20)), enlazados operativamente, a la secuencia de polinucleótidos codificante por la proteína de interés-en este caso, el polipéptido de la presente invención. Este péptido de secuencia de señalización puede estar constituido operativamente por la secuencia de señales nativas de un polipéptido de la presente invención como una secuencia señal heteróloga. Tal método para producir formas maduras de los polipéptidos de la invención es abarcado por la presente invención y puede utilizarse bien sea solo o en conjunción con otros métodos conocidos en la técnica y/o divulgados aquí.

55 Adicionalmente, la producción potenciada de proteínas recombinantes en plantas superiores ha sido obtenido recientemente por fusión N-terminal de una ubiquitina o de un péptido de proteína de recubrimiento del virus mosaico del pepino (Vease publicación internacional No. WO 00/36129). Tales métodos pueden ser aplicados para aumentar la expresión de un polipéptido de la presente invención en una planta huésped adecuada.

#### 60 **Ejemplo 21 – Proteínas de fusión.**

Los polipéptidos de la presente invención preferiblemente son fusionados a otras proteínas. Estas proteínas de fusión pueden utilizarse para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de los presentes polipéptidos a los dominios His-tag, HA-tag, proteína A, IgG y proteína de enlazamiento de la maltosa facilita la purificación (véase Ejemplos descritos aquí; véase también EP A 394,827; Trauneker, et al., Nature 331:84-86 (1988)). De la misma

5 forma, la fusión a IgG-1, IgG-3, y albúmina incrementa el tiempo de vida media in vivo. Las señales de localización nuclear fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden apuntar la proteína a una localización subcelular específica, mientras que los heterodimeros u homodimeros covalentes pueden incrementar o disminuir la actividad de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión también pueden crear moléculas quiméricas que tienen más de una función. Finalmente, las proteínas de fusión pueden incrementar la solubilidad y/o estabilidad de la proteína fusionada en comparación con la proteína no fusionada. Todos los tipos de proteínas de fusión descritos más arriba pueden realizarse modificando el protocolo siguiente, que delinea la función de un polipéptido a una molécula de IgG.

10 Rápidamente, la porción humana Fc de la molécula IgG puede ser amplificada por PCR, utilizando cebadores que barren los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita más abajo. Estos cebadores también deberían tener sitios de restricción enzimática convenientes que faciliten la clonación en un vector de expresión, preferiblemente un vector de expresión de mamífero. Nótese que los polinucleótidos se clonan con un codón de detención, pues de otra forma no se produciría una proteína de fusión.

15 La secuencia de señalización de origen natural puede utilizarse para producir la proteína (si es aplicable). Alternativamente, si la secuencia de señal de origen natural no se utiliza, el vector puede modificarse para incluir una secuencia de señal heteróloga. (Véase, por ejemplo WO 96/34891 y/o la patente de los Estados Unidos No. 6,066,781, supra.)

20 Región de IgG Fc humano

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC  
 CCAGCACCTGAATTGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA  
 CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGT  
 GGTGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG  
 ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA  
 CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT  
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA  
 ACCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG  
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGT  
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT  
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG  
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 25 GTAAATGAGTGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEQ ID NO:18)

#### Ejemplo 22 – Producción de un anticuerpo a partir de un polipéptido

30 Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos. (véase, Current Protocols, Chapter 2.). Como ejemplo de tales métodos, las células que expresan un polipéptido de la presente invención se administran a un animal para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales. En un método preferido, una preparación de la proteína se prepara y se purifica para hacerla sustancialmente libre de contaminantes naturales. Tal preparación se introduce entonces en un animal con el fin de producir antisueros policlonales de una actividad específica superior.

35 En la mayoría de los métodos preferidos, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales (o fragmentos enlazantes de proteínas de los mismos). Tales anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando

tecnología de hibridoma (Köhler et al., Nature 256:495 (1975); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981)). En general, tales procedimientos involucran la inmunización de un animal (preferiblemente un ratón) con polipéptidos o, más preferiblemente, con una célula que expresa el polipéptido. Tales células pueden cultivarse en un medio de cultivo de tejido adecuado; sin embargo, es preferible cultivar las células en medio de Earle modificada con Eagle suplementado con 10% de suero bovino fetal (inactivado a aproximadamente 56 °C), y suplementado con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1000 U/ml de penicilina, y aproximadamente 100 ug/ml de estreptomina.

Los esplenocitos de tales ratones se extraen y se fusionan con una línea celular adecuada de mielomas. Cualquier línea celular adecuada de mielomas puede emplearse de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular materna mieloma (SP20), obtenible del ATCC. Después de la fusión, las células resultantes de hibridoma son mantenidas selectivamente en medio HAT, y luego clonadas limitando la dilución tal como lo describe Wands et al. (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). Las células del hibridoma obtenidas a través de una selección son luego probadas para identificar los clones que secretan anticuerpos capaces de enlazar el polipéptido.

Alternativamente, los anticuerpos adicionales capaces de enlazar el polipéptido pueden producirse en un procedimiento de dos etapas utilizando anticuerpos antiidiotípicos. Tal método hace uso del hecho de que los anticuerpos por sí mismos son antígenos y por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se enlace a un segundo anticuerpo. Recordó testamento, los anticuerpos específicos para proteínas se utilizan para inmunizar un animal, preferiblemente un ratón. Los esplenocitos de tal animal luego se utilizan para producir células de hibridoma, y las células de hibridoma son seleccionadas para identificar clones que produzcan un anticuerpo cuya habilidad para enlazarse al anticuerpo específico de la proteína pueda bloquearse por el polipéptido. Tales anticuerpos comprenden anticuerpos antiidiotípicos al anticuerpo específico de la proteína y pueden utilizarse para inmunizar un animal con el fin de inducir formación de anticuerpos específicos para la proteína adicionales.

Será evidente que los Fab y F(ab')<sub>2</sub> y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse de acuerdo con los métodos aquí divulgados. Tales fragmentos se producen típicamente ruptura proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Alternativamente, los fragmentos de enlazamiento de proteína pueden producirse a través de de la aplicación de la tecnología de ADN recombinante a través de química sintética.

Para el uso in vivo de anticuerpos en humanos, puede ser preferible utilizar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Tales anticuerpos pueden producirse utilizando constructos genéticos derivados de células de hibridoma que producen en los anticuerpos monoclonales descritos más arriba. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos. (Véase, para revisión, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985)).

Adicionalmente, un método más preferido, los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención pueden producirse en plantas. Métodos específicos se divulgan en las patentes de los Estados Unidos, Nos. 5,959,177, y 6,080,560. Los métodos no solamente describen métodos para expresar anticuerpos, sino también los métodos para ensamblar proteínas multiméricas foráneas en plantas (esto es, anticuerpos, etc.) y la subsecuente secreción de anticuerpos desde la planta.

### **Ejemplo 23 - Subregulación de proteínas de plantas mediada por anticuerpos**

El proceso de modificar genéticamente una planta para modular características específicas, para introducir nuevas rutas o para inhibir rutas endógenas representa un área significativa de investigación en el campo agrícola. Recientemente, ha sido elucidado un nuevo método para modular la expresión genética endógena utilizando anticuerpos (véase, publicación internacional número WO 00/05391. En este ejemplo, los investigadores fueron capaces de alcanzar una inhibición del 40 y el 70% de una proteína endógena de una planta a través del uso de un constructo de anticuerpo de cadena sencilla dirigido hacia la proteína de la planta.

El método está dirigido hacia la producción de anticuerpos monoclonales, específicamente, anticuerpos de cadena sencilla, específicos para péptidos de tránsito endógenos en una planta en un esfuerzo para disminuir los valores de estado de equilibrio de tales péptidos de tránsito dentro de la planta. El método comprende la síntesis etapas: I) generar anticuerpos monoclonales en una planta específica, II) clonar el gen para dicho anticuerpo monoclonal, III) crear un vector de expresión que comprende una fusión de las secuencias genéticas de la cadena pesada y la cadena liviana de dicho gen de anticuerpo monoclonal corriente abajo del péptido guía p67 y bajo el control de un promotor de plantas constitutivo, IV) optimizarlos codones de dicho vector de fusión de cadena pesada y de cadena liviana para expresión eficiente del gen codificado del mismo en una planta, y V) transformar una planta con dicho expresor de fusión de cadena pesada y cadena liviana.

La persona experta en la técnica apreciaría los métodos descritos allí (WO 00/05391), y tendrá la habilidad de aplicar tales métodos para inhibir los niveles de expresión en estado de equilibrio de los polipéptidos de la presente invención, incluyendo variantes, fragmentos, de los mismos. La persona experimentada en la técnica apreciaría que cualquier péptido de guía (esto es, secuencia señal) de una proteína planta podría utilizarse en la creación del vector de fusión de la cadena pesada y la cadena ligera. El experto en la técnica también apreciaría que diferentes especies de plantas puede tener diferentes requerimientos de uso del codón, y así, la decisión de optimizar los codones del vector de fusión de cadena pesada y de cadena ligera se afectaría de acuerdo con los codones requeridos para la especie vegetal en particular.

El método no solamente podría no ser solamente aplicado a péptidos transientes, sino también a proteínas secretadas, proteínas de membrana, receptores y ligandos. El método podría ser aplicado en combinación con otros métodos de producción de anticuerpos en plantas. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos hacia polipéptidos de la presente invención pueden inhibir rutas específicas en una planta lo que podría incrementar los mecanismos de defensa de las plantas frente a los patógenos. Así, cuando se expresa tal anticuerpo, podría expresarse otro anticuerpo en combinación con el primero, para inhibir la patogenicidad de un patógeno de una planta dirigiendo la expresión de los anticuerpos hacia proteínas patogénicas (por ejemplo, aquellas proteínas críticas para los eventos iniciales de una infección tales como el gen BUF1 de *M. grisea*, proteínas de la glándula salival juvenil de la etapa dos que incluye, svp30, scp31a, scp31b, scp32, scp32, scp39, y scp49 de *G. rostochiensis* (WO 96/22372), etc.). Tal combinación también podría ser de valor cuando el segundo anticuerpo "antipatogenico" es un anticuerpo dirigido hacia un patógeno y fusionado a una proteína tóxica donde tal toxina podría ser quitinasa, glucanasa, lisozima, BT o colicina F, por ejemplo (véase WO 96/09398), etc.).

Como se describe en el presente documento, este método también podrá ser utilizado como medio para inhibir las reacciones alérgicas a antígenos de plantas en humanos, mamíferos, animales, etc., dirigiendo la producción de un constructo de anticuerpo de cadena sencilla específico hacia dicho antígeno de planta en la planta (a través de la metodología transgénica). En el último ejemplo, la planta no estaría limitada a plantas comestibles, puesto que la inhibición de la producción de tal antígeno de planta podría proveer beneficios a un humano eliminando el antígeno del ambiente del humano, por ejemplo, independientemente de si la planta es o no ingerida.

De interés particular para este ejemplo, es el hecho que la secreción del anticuerpo funcional a través de la membrana de plasma en células vegetales ha sido reportada para los protoplastos aislados para plantas transgénicas, y para células callosas adaptadas a cultivos en suspensión (Hein et al., *Biotechnol. Prog.* 7:455-561, 1991). Sin embargo, los niveles de anticuerpos secretados detectados en ambos sistemas de cultivo fueron extremadamente bajos. En otros estudios, se transformaron células de tabaco cultivadas con un gen que codifica un derivado de un anticuerpo sintético expresado como una cadena sencilla consistente de los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la cadena sencilla de la inmunoglobulina intacta junto con un enlazante péptido flexible (Pluckthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188, 1991; and Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988). Este anticuerpo sintético de cadena sencilla retuvo el potencial de enlazamiento del antígeno completo de la inmunoglobulina intacta pero acumulado en el espacio apoplástico extracelular de las células transformadas (Firek et al., *Plant Molecular Biology* 23:861-870, 1993), indicando que el anticuerpo estaba siendo transportado a través de la membrana plasmática pero no a través de la pared celular al ambiente externo. Además, estudios recientes han demostrado que la producción de anticuerpos se incrementa en una planta, y la expresión de proteínas heterólogas, en general, podría incrementarse influyendo en el medio de cultivo de la planta un agente estabilizador de proteínas (por ejemplo, polivinilpirrolidona), véase patente de los Estados Unidos No. 6,020,169.

#### **Ejemplo 24 - Regulación de la secreción de proteínas a través de la agregación controlada en el retículo endoplásmico.**

Como se describe más particularmente aquí, las proteínas regulan diversos procesos celulares en organismos superiores, que varían desde cambios metabólicos rápidos hasta el crecimiento y diferenciación. La producción incrementada de proteínas específicas podría utilizarse para prevenir ciertas enfermedades y/o estados de enfermedad. Por analogía, se esperaría que las proteínas también jueguen un papel primario en los mecanismos de defensa de las plantas durante las lesiones ambientales, patogenia, herbicidas e insecticidas. Así, la capacidad de modular la expresión de las proteínas específicas en un organismo proporcionaría beneficios significativos.

Se han desarrollado numerosos métodos hasta la fecha para introducir genes foráneos, bien bajo el control de un promotor inducible, constitutivamente activo o endógeno, en los organismos. De interés particular son los promotores inducibles (véase, M. Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:5547 (1992); Y. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:8180 (1994), D. No., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:3346 (1996); y V.M. Rivera, et al., *Nature Med.*, 2:1028 (1996); además de los ejemplos adicionales divulgados aquí). En un ejemplo, el fin de la eritropoyetina (Epo) fue transferido a ratones y primates bajo el control de un inductor de molécula pequeña para su expresión (por ejemplo, tetraciclina o rapamicina) (véase, D. Bohl, et al., *Blood*, 92:1512, (1998); K.G. Rendahl, et al., *Nat. Biotech.*, 16:757, (1998); V.M. Rivera, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96:8657 (1999); and X.Ye et al., *Science*, 283:88 (1999). Aunque tales sistemas permiten una inducción eficiente del gen de interés en el organismo por adición del agente inductor (esto es, tetraciclina, rapamicina, etc.), los niveles de expresión tienden a llegar a su

pico a las 24 horas y a retraerse a niveles de fondo después de 4 a 14 días. Así, la expresión transiente controlada es virtualmente imposible utilizando estos sistemas aunque tal control sería deseable.

5 Un nuevo método alternativo para controlar los niveles de expresión genética de una proteína a través de un transgen (esto es, incluye transformantes y transientes) ha sido elucidado recientemente (V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830, (2000)). Este método no controla la expresión genética en el nivel del ARNm como los sistemas antes mencionados. En vez de ello, el sistema controla el nivel de proteína en una forma activa secretada. En ausencia del agente inductor, la proteína se agrega en el ER y no es secretada. Sin embargo, la decisión del agente inductor da como resultado la desagregación de la proteína y la subsecuente secreción desde el ER. Tal sistema permite una secreción basal baja, rápida, una secreción a alto nivel en presencia del agente inductor, y una cesación rápida de la secreción al retirar el agente inductor. En efecto, la secreción de proteínas alcanzó un nivel máximo a los 30 minutos de inducción, y una cesación rápida de la secreción después de una hora de haber retirado el agente inductor. El método también es aplicable para controlar el nivel de producción de proteínas de membrana.

15 Se presentan métodos detallados en V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830, (2000)), rápidamente:

Los constructos de proteínas de difusión se crean utilizando secuencias de polinucleótidos de la presente invención con una o más copias (preferiblemente al menos 2, 3, 4 o más) de un dominio de agregación condicional (CAD) un dominio que interactúa con sí mismo en una forma irreversible para los ligandos (esto es, en presencia de un agente inductor) utilizando métodos de biología molecular conocidos en la técnica y discutidos en este documento. El dominio CAD puede ser un dominio mutante aislado de la proteína humana FKBP12 (Phe<sup>36</sup> Met) (tal como lo divulga en V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830, (2000)), o alternativamente otras proteínas que tienen dominios con propiedades reversibles de ligando y de auto agregación similares. Como principio de diseño el vector de las proteínas de fusión podría contener una secuencia de ruptura de furina enlazada operativamente entre los polinucleótidos de la presente invención y los dominios CAD. Tal sitio de ruptura permitiría la ruptura proteolítica de los dominios CAD del polipéptido de la presente invención subsecuente a la secreción del ER y por entrada en el trans-Golgi (J.B. Denault, et al., FEBS Lett, 379:113, (1996)).

Alternativamente, el técnico experimentado reconocería que cualquier secuencia de ruptura proteolítica podría ser sustituida por la frecuencia de furina dado que la secuencia sustituida es susceptible de ruptura bien sea por vía endógena (por ejemplo, la secuencia de furina) o por vía exógena (por ejemplo, post secreción, post purificación, post producción, etc.). La secuencia preferida de cada característica del constructo de la proteína de fusión, de la dirección 5' a 3' con cada característica que está siendo enlazada operativamente a la otra, sería un promotor, una secuencia de señal, un número "X" de los dominios (CAD)x, la secuencia de furina (u otra secuencia proteolítica), y la secuencia de codificación del polipéptido de la presente invención. El experto apreciaría que el promotor y la secuencia de señalización, independientemente una de la otra, serían bien el promotor endógeno o la secuencia de señalización de un polipéptido de la presente invención, o alternativamente, sería una secuencia de señal heteróloga y un promotor.

Los métodos específicos descritos aquí para controlar los niveles de secreción de proteínas a través de la agregación controlada de ER no pretenden ser limitantes y serían aplicables en general a cualquiera de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención, incluyendo variantes, homólogos, ortólogos y fragmentos de los mismos.

#### 45 **Ejemplo 25 - Alteración de los sitios de glicosilación de la proteína para potenciar las características de secreción de los polipéptidos de la invención.**

Muchas superficies superficies y proteínas de las células eucarióticas se procesan post translacionalmente para incorporar carbohidratos enlazados en N y O (Kornfeld and Kornfeld (1985) Annu. Rev. Biochem. 54:631-64; Rademacher et al., (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:785-838). La glicosilación de proteínas se cree que sirve para una gran variedad de funciones incluyendo: aumento del plegamiento de proteínas, inhibición de la agregación de proteínas, regulación del tráfico intracelular a los organelos, incremento de la resistencia a la proteólisis, modulación de la antigenicidad de las proteínas, y mediación de la adhesión intercelular (Fiedler and Simons (1995) Cell, 81:309-312; Helenius (1994) Mol. Biol. Of the Cell 5:253-265; Olden et al., (1978) Cell, 13:461-473; Caton et al.,(1982) Cell, 37:417-427; Alexander and Elder (1984), Science, 226:1328-1330; and Flack et al., (1994), J. Biol. Chem., 269:14015-14020). En organismos superiores, la naturaleza y grado de glicosilación pueden afectar de forma marcada la vida media circulante y la vida disponible de las proteínas por mecanismos que involucran el consumo y eliminación mediado por el receptor (Ashwell and Morrell, (1974), Adv. Enzymol., 41:99-128; Ashwell and Harford (1982), Ann. Rev. Biochem., 51:531-54). Han sido identificados sistemas receptores que se cree que juegan un papel principal en la eliminación de las proteínas del suero a través del reconocimiento de diversas estructuras del carbohidrato sobre las glicoproteínas (Stockert (1995), Physiol. Rev., 75:591-609; Kery et al., (1992)). Así, las estrategias de producción que dan como resultado un enlace incompleto de los residuos de ácido siálico podrían proveer medios para acortar biodisponibilidad y la vida media de las glicoproteínas. Por el contrario, las estrategias de expresión que dan como resultado la saturación de los sitios de enlace del ácido siálico terminal podrían alargar la biodisponibilidad y la vida media de la proteína.

En el desarrollo de las glicoproteínas recombinantes para uso como productos farmacéuticos, por ejemplo, se ha especulado que la farmacodinámica de las proteínas recombinantes puede modularse mediante la adición o eliminación de sitios de glicosilación de una estructura primaria de glicoproteínas Berman y Lasky (1985a) Trends in Biotechnol., 3:51-53). Sin embargo, hay estudios que han reportado que la eliminación de sitios de glicosilación enlazados a N frecuentemente impiden el transporte intracelular y dan como resultado la acumulación intracelular de variantes del sitio de glicosilación (Machamer and Rose (1988), J. Biol. Chem., 263:5955-5960; Vesiculaagher et al., (1992), J. Viology., 66:7136-7145; Collier et al., (1993), Biochem., 32:7818-7823; Claffey et al., (1995) Biochemica et Biophysica Acta, 1246:1-9; Dube et al., (1988), J. Biol. Chem. 263:17516-17521). Mientras que las variantes en los sitios de glicosilación de las proteínas puede expresarse en forma intracelular, se han mostrado que es difícil recuperar cantidades útiles a partir de el medio de cultivo de células con crecimiento condicionado.

Además, no es claro hasta qué nivel un sitio de glicosilación en una especie será reconocido por la maquinaria de glicosilación de otra especie. Debido a la importancia de la glicosilación en el metabolismo de las proteínas, particularmente la secreción y/o expresión de la proteína, que el que una señal de glicosilación sea reconocida puede determinar profundamente la capacidad de una proteína para ser expresada como bien sea de forma endógena o recombinante, en otro organismo (esto es, expresando una proteína de maíz en E. coli una proteína de E. coli en maíz, etc.). Así, puede ser deseable agregar, eliminar o modificar un sitio de glicosilación y posiblemente añadir un sitio de glicosilación de una especie a una proteína de otra especie para mejorar las características funcionales, purificación por bioprocesos y/o estructurales de la proteína (por ejemplo, un polipéptido de la presente invención).

Puede emplearse un cierto número de métodos para identificar la localización de los sitios de glicosilación en una proteína. Un método preferido es ejecutar una secuencia en proteína traducida a través del programa de ordenador PROSITE (Swiss Institute of Bioinformatics). Una vez identificados, los sitios pueden eliminarse o impedirse sistemáticamente, al nivel del ADN utilizando metodología de mutagénesis conocida en la técnica y disponible para la persona experimentada, utilizando preferiblemente mutagénesis dirigida por PCR (véase Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). De la misma forma, los sitios de glicosilación pueden añadirse, o modificarse al nivel del ADN utilizando métodos similares, preferiblemente dos por PCR (véase, Maniatis, supra.). Los resultados de la modificación de los sitios de glicosilación para una proteína en particular (por ejemplo, solubilidad, potencial de secreción, actividad, agregación, resistencia proteolítica, etc.) podrían ser analizados entonces utilizando métodos conocidos en la técnica.

#### **Ejemplo 26 – Transformación de dicotiledóneas**

Los polinucleótidos de la presente invención, incluyendo los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención, además de los polinucleótidos que codifican anticuerpos contra los polipéptidos de la presente invención pueden ser utilizados para transformar los monocotiledóneas en un esfuerzo para conferir rutas específicas hacia la planta. Tales polinucleótidos pueden bien ser polinucleótidos de longitud completa, fragmentos, la cadena complementaria, o variantes de los mismos, y bien pueden estar por sí mismos u operativamente fusionados a polinucleótidos heterólogos como se describe en más detalle en el presente documento.

Las técnicas de transformación para las dicotiledóneas son bien conocidas en la técnica incluyen técnicas basadas en Agrobacterium y técnicas que no requieren Agrobacterium. Las técnicas sin Agrobacterium involucran la toma de material genético exógeno directamente por los protoplastos o las células. Esto puede lograrse por PEG o consumo mediado por electroporación, administración mediada por bombas de partículas, o microinyección. Ejemplos de estas técnicas están descritos por Paszkowski et al., EMBO J 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), and Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987). En cada caso las células transformadas se regeneran en plantas enteras utilizando técnicas estándar conocidas en el arte.

La transformación mediada por Agrobacterium es la técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas por su alta eficiencia de transformación y su amplia utilidad con muchas especies diferentes. Las muchas especies de cultivo que pueden ser transformables de forma rutinaria por Agrobacterium incluyen tabaco, tomate, girasol, algodón, colza, patata, soja, alfalfa y álamo (EP 0 317 511 (algodón), EP 0 249 432 (tomate, de Calgene), WO 87/07299 (Brassica, de Calgene), patente de Estados Unidos No. 4,795,855 (álamo)). La transformación por Agrobacterium típicamente involucra transferencia del vector binario que porta el ADN foráneo de interés (por ejemplo pCIB200 o pCIB2001) a una cepa de Agrobacterium apropiada que puede depender del complemento de los genes vir portados por la cepa de Agrobacterium huésped bien sobre un plásmido co-residente TI o por vía cromosómica (por ejemplo cepa pCIB542 para pCIB200 y pCIB2001 (Uknes et al. Plant Cell 5: 159-169 (1993)). La transferencia del vector binario recombinante al Agrobacterium se logra por un procedimiento de coincidencia triparental utilizando E. coli que porte del vector binario recombinante, una cepa auxiliar de E. coli que porte un plásmido tal como pRK2013 y que es capaz de movilizar el vector binario recombinante en la cepa de Agrobacterium objetivo. Alternativamente, el vector binario recombinante puede transferirse a Agrobacterium mediante transformación de ADN (Hofgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16: 9877 (1988)).

La transformación de especies vegetales objetivo mediante *Agrobacterium* recombinante involucró usualmente es co- cultivo de *Agrobacterium* con explantados de la planta y siguiendo protocolos bien conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera sobre un medio seleccionable que porta el marcador de la resistencia al antibiótico o el herbicida presente entre los bordes del ADN -T del plásmido binario.

Otros métodos para la transformación de las dicotiledóneas son conocidos en la técnica. Así, este ejemplo puede ser considerado como limitantes del alcance de la invención a sólo aquellos ejemplos ilustrados antes o en cualquier otro lugar de este documento.

## 10 Ejemplo 27 – Transformación de monocotiledóneas

Los polinucleótidos de la presente invención, incluyendo los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención, además de los polinucleótidos que codifican los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención pueden ser utilizados por transformar las monocotiledóneas en un esfuerzo para conferir rutas específicas a la planta. Tales polinucleótidos pueden estar bien en la forma de polinucleótidos de longitud completa, fragmentos, la cadena complementaria, o variantes de los mismos, o bien pueden estar por sí mismos o de forma operativa fusionados con polinucleótidos heterólogos tal como se describe en más detalle en el presente documento.

La transformación de la mayoría de las especies de monocotiledóneas también se ha hecho rutinaria. Las técnicas preferidas incluyen la transferencia genética directa en los protoplastos utilizando técnicas de PEG o electroporación, y bombardeo de partículas en el tejido calloso. Las transformaciones pueden llevarse a cabo con una especie individual de ADN o especies múltiples de ADN (esto es, co- transformación) y ambas de estas técnicas son adecuadas para su uso dentro de esta invención. La cotransformación puede tener la ventaja de evitar la construcción de un vector complejo y generar plantas transgénicas con loci no ligados para el gen de interés y el marcador seleccionable, permitiendo la eliminación del marcador seleccionable en generaciones subsecuentes, si esto se considera deseable. Sin embargo, una desventaja del uso de la co- transformación es la frecuencia de menos de 100% con la cual especie de ADN separada se integra en el genoma (Schocher et al. *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

Las solicitudes de patente EP 0 292 435 (para Ciba-Geigy), EP 0 392 225 (para Ciba-Geigy) y WO 93/07278 (para Ciba-Geigy) describe técnicas para la preparación de callos y protoplastos a partir de una línea elite cruzada de maíz, la transformación de los protoplastos utilizando PEG o electroporación, y la regeneración de las plantas de maíz a partir de los protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) y Fromm et al., *Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) se han publicado técnicas para la transformación de una línea de maíz derivado de A188 utilizando bombardeo de partículas. Adicionalmente, la solicitud WO 93/07278 (para Ciba-Geigy) y Koziel et al., *Biotechnology* 11: 194-200 (1993)) describen técnicas para la transformación de líneas elite cruzadas de maíz por bombardeo de partículas. Esta técnica utiliza embriones de maíz no maduros 1.5-2.5 mm de longitud escindidos de una espiga de maíz 14 -15 días después de la polinización y un dispositivo PDS-1000H Biolisticas para bombardeos.

La transformación del arroz también puede llevarse a cabo mediante técnicas de transferencia directa de genes utilizando protoplastos o bombardeo de partículas. La transformación mediada por protoplastos ha sido descrita por los tipos Japonica y tipos Indica (Zhang et al., *Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimamoto et al. *Nature* 338: 274-277 (1989); Datta et al. *Biotechnology* 8: 736-740 (1990)). Ambos tipos son transformables de forma rutinaria utilizando bombardeo de partículas (Christou et al. *Biotechnology* 9: 957-962(1991)).

La solicitud de patente EP 0 332 581 (para Ciba-Geigy) describe técnicas para la generación, transformación y regeneración de protoplastos de Pooidaeae. Éstas técnicas permiten la transformación de *Dactylis trigo*. Adicionalmente, la transformación de trigo ha sido descrita por Vasil et al., *Biotechnology* 10: 667-674 (1992)) utilizando bombardeo de partículas en células tipo C largo término de callo regenerable, y también por et al., *Biotechnology* 11: 1553-1558 (1993)) y Weeks et al., *Plant Physiol.* 102: 1077-1084 (1993) utilizando el bombardeo con partículas de embriones inmaduros y callos derivados de embriones inmaduros. Una técnica preferida para la transformación de trigo, sin embargo, involucra la transformación del trigo por bombardeo con partículas de embriones inmaduros e incluye bien sea una etapa de sacarosa alta o de maltosa alta antes de la administración del gen. Antes del bombardeo, cualquier número de embriones (0.75-1 mm en longitud) se colocan sobre una placa sobre medio MS con 3% de sacarosa (Murashige & Skoog, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) y 3 mg/l de 2,4-D de inducción de los embriones somáticos los que se dejan proceder en la oscuridad. En el día escogido para el bombardeo los embriones son retirados del medio de inducción en el osmoticum (esto es medio de inducción con sacarosa o maltosa agregados a la concentración deseada, típicamente 15%). Los embriones se dejan plasmolizar durante 2-3 horas y luego son bombardeados. Veinte embriones por placa objetivo es típico, aunque no crítico. Un plásmido apropiado que porta el gen (tal como pCIB3064 o pSG35) se precipita sobre partículas de oro de tamaño micrométrico utilizando procedimientos estándar. Se dispara cada placa de embriones con el DuPont Biolisticas, dispositivo de helio que utiliza una presión de explosión de aproximadamente 1000 psi utilizando un filtro estándar de 80 mallas. Después del bombardeo, los embriones se colocan de nuevo en la oscuridad para recuperación durante aproximadamente 24 horas (aún en osmoticum) después de 24 horas, los embriones son retirados del osmoticum y colocados de nuevo sobre el medio de inducción donde permanecen por aproximadamente un mes

antes de la regeneración. Aproximadamente un mes después el embrión se explanta con el callus embriogénico en desarrollo y se transfieren los medios de regeneración (MS+1 mg/litro de NAA, 5 mg/litro de GA), que contiene adicionalmente el agente de selección apropiado (10 mg/l de basta en el caso de pCIB3064 y 2 mg/l metotrexato en el caso de pSOG35). Después de aproximadamente un mes, los brotes desarrollados se transfieren a contenedores estériles grandes conocidos como "GA7" que contienen MS de fuerza media, 2% sacarosa y la misma concentración del agente de selección.

Un método adicional para transformar las monocotiledóneas se encuentra en la publicación internacional No. WO 00/12734 y describe la aplicación del sistema Ac-Ds de transposón a la inserción de transgenes en plantas.

Otros métodos para la transformación de monocotiledóneas son conocidos en la técnica. Así, este ejemplo no debería ser considerado como limitante del alcance de la invención a solamente aquellos ejemplos ilustrados anteriormente o en otro lugar de la misma.

### **Ejemplo 28 - Metodo para potenciar la actividad biológica/características funcionales de la invención a través de la evolución molecular.**

Aunque muchas de las proteínas más activas biológicamente conocidas son altamente efectivas por su función especificada en organismo, frecuentemente poseen características que las hacen deseables para aplicaciones transgénicas, terapéuticas, agrícolas y/o industriales. Entre estas tendencias, una vida media fisiológica corta es el problema más prominente, y está presente bien al nivel de la proteína, o al nivel de los ARNm de las proteínas. La capacidad para extender la vida media, por ejemplo, sería particularmente útil para el uso de proteínas en terapia genética, plantas transgénicas o producción de animales, los bioprocesos de producción y purificación de la proteína, y el uso de la proteína como un modulador (por ejemplo, herbicida, insecticida, etc.), entre otros. Por lo tanto hay una necesidad de identificar variantes novedosas de proteínas aisladas que posean características que potencien su aplicación como un agente terapéutico para tratar enfermedades tan todo de origen vegetal como de origen animal, además de la aplicabilidad de las proteínas a aplicaciones industriales y agrícolas comunes.

Así, un aspecto de la presente invención se relaciona con la capacidad de potenciar características específicas de la invención a través de la evolución molecular dirigida. Tal potenciamiento puede, en un ejemplo no limitante, beneficiarse de la utilidad de las invenciones como un componente esencial en un kit, los atributos físicos de las invenciones tales como su solubilidad, estructura y optimización del codón, la actividad biológica específica de las invenciones, incluyendo cualquier actividad enzimática asociada, la cinética enzimática de las proteínas,  $K_i$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_d$  de las proteínas, actividad proteína-proteína, actividad de enlazamiento proteína-ADN, actividad antagonista/inhibidora (incluyendo interacción directa o indirecta), actividad agonista (incluyendo interacción directa o indirecta), la antigenicidad de las proteínas (por ejemplo, cuando sea deseable bien sea incrementar o disminuir el potencial antigénico de la proteína), la inmunogenicidad de la proteína, la capacidad de la proteína para formar dímeros, trimeros o multímeros bien sea consigo mismo o con otras proteínas, la eficacia antigénica de la invención, incluyendo su uso subsecuente como tratamiento preventivo para enfermedades o estados de enfermedad, o como un efector para apuntar a genes enfermos. Además, la capacidad para potenciar características específicas de una proteína también puede ser aplicable para cambiar la actividad caracterizada de una enzima a una actividad completamente no relacionada con su actividad inicialmente caracterizada. Otros potenciamientos deseables de la invención serían específicos para cada proteína individual y por lo tanto serían bien conocidos en la técnica y contemplados por la presente invención.

La evolución dirigida está compuesta de varias etapas. La primera etapa es establecer una biblioteca de variantes para el gen o proteína de interés. La etapa más importante es entonces seleccionar aquellas aborden la actividad que se desea identificar. El diseño de las selecciones es esencial puesto que su selección debería ser suficientemente selectiva para eliminar variantes no útiles, pero no tan restrictiva para eliminar todas las variantes. La última etapa entonces es repetir todas las detecciones anteriores utilizando la mejor variante de la selección previa. Cada ciclo sucesivo, puede entonces ser ajustado según sea necesario, tal como mediante un incremento de la restricción de la selección, por ejemplo.

Durante los años, ha habido un cierto número de métodos desarrollados para introducir mutaciones en macromoléculas. Algunos de estos métodos incluyen, mutagénesis aleatoria, PCR con "tendencia al error", mutagénesis química, mutagénesis dirigida a un sitio, y otros métodos bien conocidos en la técnica (para una lista completa de métodos actuales de mutagénesis, véase Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). Típicamente tales métodos se han utilizado, por ejemplo, como herramientas para identificar la región o regiones funcionales principales de una proteína o la función de dominios específicos de una proteína (si se trata de una proteína de dominios múltiples). Sin embargo, tales métodos se han aplicado más recientemente a la identificación de variantes de macromoléculas con características específicas o potenciadas.

La mutagénesis aleatoria ha sido el método más ampliamente reconocido hasta la fecha. Típicamente, se ha llevado a cabo bien a través del uso PCR "con tendencia al error" (como se describe en Moore, J., et al, Nature Biotechnology 14:458, (1996)), o a través de la aplicación de oligonucleótidos sintéticos aleatorios correspondientes

a regiones específicas de interés (tal como lo describe Derbyshire, K.M. et al, Gene, 46:145-152, (1986), y Hill, DE, et al, Methods Enzymol., 55:559-568, (1987)). Ambas aproximaciones tienen límites al nivel de la mutagénesis que puede ser obtenida. Sin embargo, cualquier intento permite al investigador controlar efectivamente la tasa de mutagénesis. Esto es particularmente importante considerando el hecho de que las mutaciones benéficas para la actividad de la enzima son bastante raras. En efecto, el usar un nivel muy alto de mutagénesis puede contrarrestar o inhibir el beneficio deseado de una mutación útil.

A la vez que ambos métodos antes mencionados son efectivos para crear reservas aleatorizadas de variantes de macromoléculas, se elucidado recientemente un tercer método, denominado "Barajado de ADN" o PCR sexual (WPC, Stemmer, PNAS, 91:10747, (1994)). El barajado de ADN ha sido denominado también como "evolución molecular dirigida", "barajado del exón", "revolución enzimática dirigida", "evolución in vitro", y "evolución artificial". Tales términos de referencia son conocidos en el arte y están abarcados por la invención. Este nuevo método, preferido aparentemente supera las limitaciones de los métodos anteriores en que no solamente propaga rutas positivas, sino que simultáneamente elimina rutas negativas en la progenie resultante.

El barajado del ADN logra realizar esta tarea combinando lo principal de la recombinación in vitro, junto con el método de PCR "con tendencia al error". En efecto, se comienza con una reserva aleatoriamente digerida de pequeños fragmentos de su gen, , creados por digestión con ADNasa I y luego introduciendo dichos fragmentos aleatorios en una reacción de ensamblaje por PCR " con tendencia al error". Durante la reacción de PCR, dimensionados aleatoriamente no solamente hibridizan a su cadena cognada, sino también hibridizan a otros fragmentos de ADN correspondientes a diferentes regiones del polinucleótido de interés - regiones no típicamente accesibles a través de la hibridización del polinucleótido completo. Además, puesto que la reacción de ensamblaje por PCR utiliza condiciones de reacción PCR "con tendencia al error" las mutaciones aleatorias se introducen durante la etapa de síntesis del ADN de la reacción de PCR para todos los fragmentos - diversificando adicionalmente los sitios de hibridización potencial durante la etapa de anhelación de la redacción.

Podría utilizarse una variedad de condiciones de reacción para llevar a cabo la reacción de barajado de ADN. Sin embargo, las condiciones de reacción específicas para el barajado de ADN se proporcionan, por ejemplo, en el PNAS, 91:10747, (1994). Resumiendo:

Se prepara el sustrato de ADN que va a ser sometido a la reacción de barajado de ADN. La preparación puede hacerse en forma de purificación simple del ADN eliminando material celular contaminante, sustancias químicas, reguladores, cebadores de oligonucleótidos, desoxinucleótidos, ARNs, etc., y puede abarcar el uso de kits de purificación de ADN como los que prové Qiagen, Inc., o Promega Corp., por ejemplo.

Una vez que el sustrato de ADN ha sido purificado, sería sometida a digestión con ADNasa I. Aproximadamente 2-4 ug del sustrato de ADN sería digerido con 0.0015 unidades de ADNasa I (Sigma) por ul en 100ul de Tris-HCL 50mM, pH 7.4/1mM, MgCl<sub>2</sub> durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos resultantes de 10-50bp podrían ser purificados entonces sometiéndolos a un gel de agarosa de punto de fusión bajo al 2% por electroforesis sobre papel de intercambio iónico DE81 (Whatman) o podría ser purificados utilizando concentradores Microcon (Amicon) del corte de peso molecular apropiado, o podría acusarse columnas de purificación con oligonucleótidos (Qiagen), además de otros métodos conocidos en la técnica. Si se usa papel de intercambio iónico DE81, los fragmentos de 10 -50bp podrían eludirse desde dicho papel utilizando NaCl 1M, seguido por precipitación con etanol.

Los fragmentos purificados resultantes serían sometidos entonces a una reacción de ensamblaje por PCR por resuspensión en una mezcla de PCR que contiene 2mM de cada uno de los siguientes: dNTP, 2.2mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10mM de Tris•HCL, pH 9.0, y 0.1% de Triton X-100, a una concentración final del fragmento de 10 -30ng/ul. No se añaden cebadores en este punto. La Taq DNA polimerasa (Promega) podría utilizarse a 2.5 unidades por 100ul de mezcla de reacción. Se usaría un programa de PCR a 94 °C durante 60 segundos; 94 °C durante 30 segundos, 50 -55 °C durante 30 segundos y 70 °C durante 30 segundos utilizando 30 -45 ciclos, seguido por 72 °C durante 5 minutos utilizando un termociclador MJ Research (Cambridge, MA) PTC -150. Después de que la reacción de ensamblaje está terminada, se introduciría una dilución 1:40 del producto resultante sin cebadores en una mezcla de PCR (utilizando la misma mezcla reguladora usada para la reacción de ensamblaje) que contendría 0.8um de cada cebadores y se sometería a una mezcla de 15 ciclos de PCR (utilizando 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos). Los cebadores citados serían cebadores correspondientes a las secuencias de ácido nucleico del polinucleótido o polinucleótidos utilizados en la reacción de barajado. Dicho cebadores podrían consistir de pares de bases de ácidos nucleicos modificados utilizando métodos conocidos en la técnica y citados a lo largo de lo largo de este documento, o podría contener secuencias adicionales (por ejemplo, para añadir sitios de restricción, pares de bases específicas mutantes, etc.).

El producto resultante shuffled ensamblado y amplificado puede ser purificado utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, kits de purificación de PCR Qiagen) y luego clonados subsecuentemente utilizando enzimas de restricción apropiadas.

Aunque se ha publicado un cierto número de variaciones de barajado del ADN hasta la fecha, tales variaciones serían obvias para las personas experimentadas en la técnica y están abarcadas por la invención. El método de

barajado de ADN también puede ser ajustado al nivel deseado de mutagénesis utilizando los métodos descritos por Zhao, et al. (Nucl Acid Res., 25(6):1307-1308, (1997).

5 Como se describe más arriba, una es que la reserva aleatorizada ha sido creada, puede ser sometida a una selección específica para identificar la variante que posee las características deseadas. Una vez que se ha identificado a la variante, el ADN correspondiente a la variante puede utilizarse como sustrato de ADN para iniciar otra ronda de barajado de ADN. Este ciclo de barajado, seleccionando la variante optimizada de interés, y luego a haciendo rebarajado, puede repetirse hasta que se obtenga la variante final. Ejemplos de selecciones modelo aplicadas para identificar variantes creadas utilizando tecnología de barajado de ADN pueden encontrarse en las siguientes publicaciones: J. C., Moore, et al., J. Mol. Biol., 272:336-347, (1997), F.R., Cross, et al., Mol. Cell. Biol., 18:2923-2931, (1998), y A. Cramer., et al., Nat. Biotech., 15:436-438, (1997).

15 El barajado de ADN tiene varias ventajas. Primero, hace uso de mutaciones benéficas. Conde se combinan con una selección, el barajado del ADN permite el descubrimiento de las mejores combinaciones mutacionales y no asume que la mejor combinación contiene todas las mutaciones en una población. En segundo lugar, la recombinación sucede simultáneamente con mutagénesis puntual. Un efecto de forzar la polimerasa del ADN para sintetizar genes de longitud completa a partes del pequeño fragmento de la reserva de ADN es una rata de mutagénesis de fondo. En combinación con un método de selección restrictivo, la actividad enzimática ha evolucionado hasta un incremento de 16,000 veces sobre la forma de tipo silvestre de la enzima. En esencia, la mutagénesis de fondo produjo la variabilidad genética sobre la cual actúa la recombinación para potenciar la actividad.

25 Una tercera característica de la recombinación es que puede ser utilizada para eliminar mutaciones deletéreas. Como se discutió más arriba, durante el proceso de la aleatorización, para cada una de las mutaciones benéficas, puede haber al menos una o más mutaciones neutras o inhibitoras. Tales mutaciones pueden eliminarse incluyendo en la reacción de ensamblaje un exceso de los fragmentos tipo silvestre tamaño aleatorio, además de los fragmentos de tamaño aleatorio del mutante seleccionado para la selección en la selección previa. Durante la selección siguiente, algunas de las variantes más activas del polinucleótido/polipéptido/enzima deberían haber perdido las mutaciones inhibitoras.

30 Finalmente, la recombinación permite un procesamiento en paralelo. Esto representa una ventaja significativa puesto que son probablemente características múltiples las que harían una proteína más deseable (por ejemplo, solubilidad, actividad, etc.). Puesto que es crecientemente difícil seleccionar más de una ruta deseable a la vez, otros métodos de evolución molecular tienden a ser inhibitoros. Sin embargo, utilizando la recombinación, sería posible combinar los fragmentos aleatorizados de las mejores variantes representativas para las diversas rutas, luego seleccionar las propiedades múltiples de una vez.

35 El barajado de ADN también puede ser aplicado a los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención para disminuir su inmunogenicidad en un huésped especificado. Por ejemplo, una variante particular de la presente invención podría crearse y aislarse utilizando la tecnología de barajado de ADN. Tal variante puede tener todas las características deseadas, aunque puede ser un polipéptido que tenga una estructura no nativa que podría no ser reconocida posteriormente como una "auto", sino más bien como una "foránea", y así activar una respuesta inmune en el huésped dirigida contra la variante novedosa. Tal limitación puede ser superada, por ejemplo incluyendo una copia de la secuencia de genes para un hortólogo xenobiotico de la proteína nativa con la secuencia de genes del gel variante novedoso en uno o más ciclos de barajado de ADN. La relación molar de los ADN variantes hortólogos y novedosos podría variarse con concordantemente. De forma ideal, la variante híbrida resultante identificada contendría al menos algo de la secuencia de la variante novedosa original que proporcionó las características deseadas.

40 De la misma forma, la invención abarca la aplicación de la tecnología de Barajado de ADN a la evolución de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, donde uno o más ciclos de barajado de ADN incluyen, además del ADN patrón genético, oligonucleótidos que codifican para secuencias alélicas conocidas, secuencias de codón optimizadas, secuencias variantes conocidas, secuencias de polimorfismo de polinucleótidos conocidas, secuencias hortólogas conocidas, secuencias homólogas conocidas, secuencias homólogas adicionales, secuencias adicionales no homólogas secuencias de otras especies, y cualquier número y combinación de las anteriores.

55 Además de los métodos descritos más arriba, hay un cierto número de métodos relacionados que pueden ser aplicables o deseables en ciertos casos. Representativos entre ellos están los métodos discutidos en las solicitudes PCT WO 98/31700, y WO 98/32845, que se incorporan aquí como referencia. Adicionalmente, también pueden aplicarse métodos relacionados a la secuencias de polinucleótidos de la presente invención con el fin de hacer evolucionar la invención para crear variantes ideales para uso en terapia genética, ingeniería de proteínas, evolución de células enteras que contienen la variante, o en la evolución de rutas enzimáticas completas que contienen polinucleótidos de la invención, tal como se describen las solicitudes PCT 98/13485, WO 98/13487, WO 98/27230, WO 98/31837, y Cramer., A., et al., Nat. Biotech., 15:436-438, (1997), respectivamente.

60 Métodos adicionales para aplicar tecnología de barajado de ADN a los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, incluyendo sus aplicaciones propuestas, pueden encontrarse en la patente de los Estados Unidos No. 5,605,793;

solicitud PCT No. WO 95/22625; solicitud PCT No. WO 97/20078; solicitud PCT No. WO 97/35966; y solicitud por PCT No. WO 98/42832; y la solicitud PCT No. WO 00/09727 proporciona específicamente métodos para aplicar barajado de ADN a la identificación de cultivos selectivos a herbicidas que podrían ser aplicados a los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención; adicionalmente, la solicitud PCT No. WO 00/12680 proporcione métodos y composiciones para generar, modificar, adaptar y optimizar secuencias de polinucleótidos que confieren propiedades fenotípicas detectables sobre especies vegetales.

### Ejemplo 29 – Determinación funcional de proteína utilizando microarreglos.

Preparación de microarreglos.

Los clones en las células de levadura YTK12 se cultivan sobre placas CMD-W a 30 °C. Se utiliza PCR en 96 pozos para amplificar los insertos como sigue: por clon, mezcla de reacción de 100ul que consiste de 80ul de agua estéril, 10ul de regulador RedTaq 10X (Sigma), 2ul de mezcla dNTP 10mM (Boehringer Mannheim), 2ul de un cebador de avance correspondiente al polinucleótido de la presente invención, 100ng/ul, 2ul de cebador T7 100ng/ul, 4ul de ADN polimerasa RedTaq (sigma) y una alícuota de la colonia de levaduras y se mezcla todo y se somete a 95 °C durante 2 minutos (una vez), luego 94 °C durante 30 segundos, seguido por 50 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 30 segundos (35 a 40 ciclos) y finalmente la etapa de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se purifican utilizando cartuchos de filtración por gel (Edge BioSystems) dos veces para eliminar completamente el exceso de cebadores. Todos los productos de PCR se evalúan por electroforesis en gel de agarosa. Utilizando un robot (TECAN), los productos de PCR se transfieren a placas de 384 pozos y luego se secan muestras bajo vacío y se suspenden en 20ul de DMSO al 50%.

Las muestras de ADN son dispuestas sobre láminas para microscopio de vidrio recubiertas con aminosilano utilizando un marcador de microarreglo GEN III de Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech. Después las muestras se secan al aire, el entrecruzamiento por UV de las muestras a la lámina puede hacerse exponiendo las láminas 50mJ pulsos de luz de longitud de onda de 254nm

Aislamiento de ARN y preparación de ARNm marcado por transcripción in vitro de ADNc.

El ARN total es aislado de diversos tejidos (hojas, raíces, flor, tallo, meristemas, cultivos celulares, tratados o no tratados con sustancias químicas o sometido o no atenciones bióticas o abióticas) utilizando un kit RNeasy de Qiagen. El ARN total es convertido en ADN como se describe más abajo. La síntesis de la primera cadena de ADN puede llevarse a cabo como sigue:

3-5 ug de RNA total se mezcla con 1 ul del cebador T7-oligo(dT)<sub>24</sub> 5'-GGCCAGTGAATT GTAATACGCTCACTATAGGGAGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID NO:19) y el volumen final se lleva a 12ul con DEPC-H<sub>2</sub>O. Después de calentar el tubo a 70° durante 5 minutos, se agregan 4ul de 5 X primer regulador de cadena (Life Technology), 1ul de DTT (0.1M) y 1ul de dNTP 10 mM. Después de 2 minutos de incubación a 37 °C, se añaden 2ul transcriptasa reversa (SSII RT, 200-unidades/ul, de Life Technology) y se continúa con incubación de 37 °C.

La síntesis de la segunda cadena se lleva a cabo como sigue: a la mezcla de reacción de la primera cadena se agregan 89 ul de DEPC-H<sub>2</sub>O, 30 ul dNTP 10mM, 1 ul de ADN ligasa de E. coli 10 U/ul, 4 ul de ADN polimerasa de E. coli de 10 U/ul, y 2 ul de RNasa H de E. coli de 2 U/ul y se incuba 16 dos sentidos durante 2 horas. Luego se agregan 2ul de ADN polimerasa T4 de 5 U/ul y se incuba a 16 °C durante 5 minutos. La reacción se detiene por una extracción con fenol/cloroformo y el sobrenadante es precipitado en presencia de 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 volúmenes de NH<sub>4</sub>Ac 5M. Después de mezclar la muestra, se centrifuga inmediatamente a 12,000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La pella se lava dos veces con etanol al 80% y se seca al aire antes de disolverla en 2 ul de agua libre de RNasa. La transcripción in vitro con marcación con colorante Cy se lleva a cabo como sigue:

Por reacción, se combinan 1ul de regulador de reacción T7 10 X (Ambion), 3ul de mezcla de ATP, CTP, GTP 25mM, 1ul de UTP 20 mM (Ambion), 1ul de ADNc, 3ul Cy3 o Cy5 de 5Mm (Amersham), 0.5ul del producto de PCR de control interno (esto es, CCR5 humano), 1ul de mezcla enzimática (Ambion, MEGAscript™) y 1ul de ARN polimerasa T7 (USB, 100 unidades/ul) y se incuban a 37 °C durante 4-6 horas en un baño de agua en la oscuridad. El ADNc patrón se elimina entonces incubando 37 °C durante 15 minutos con 1ul de DNasaI libre de RNasa. La sonda de ARN se purifica entonces utilizando el mini protocolo de RNease para la purificación de la sonda de ARN (Qiagen). Cada sonda se protege en almacenamiento de la luz, -70 °C.

### Hibridización en microarreglo y análisis de datos

Las dos reservas de ARNm que van a ser comparadas se mezclan a una lámina de microarreglo en 36ul de una mezcla de hibridización que contiene 50% de formamida, 5X SSC, 0.1% SDS. La hibridización toma lugar bajo una laminilla de vidrio en un tubo plástico humidificado con tapa, en un horno a 42 °C durante 14 -18 horas. Las láminas

son lavadas entonces dos veces durante 5 minutos a 42 °C 0.5X SSC, 0.1% SDS, una vez durante 10 minutos a 42 °C en 0.25X SSC, 0.1% SDS, una vez en 0.25X SSC, 0.1% SDS a 55°C durante 30 minutos, antes de secarse bajo una corriente suave de N<sub>2</sub>.

5 El barrido de las láminas se lleva a cabo con un Generation III Array Scanner (Molecular Dynamic) a un PMT de 665V para las sondas marcadas con Cy3 y un PMT de 685V para sondas marcadas con Cy5. La captura de los datos y el análisis crítico (eliminación del fondo, normalización y valores promedio) se hace utilizando el software ArrayVision™ (Imaging Research, Inc.). La relación de fluorescencia Cy5/Cy3 y la relación transformada en log<sub>10</sub> se calculan a partir de los valores normalizados. El software SpotFire™ (Spotfire, Inc.) y GeneSpring™ (Silicon Genetics, Inc.) se utilizan para la visualización de los datos y el análisis de aglomeración.

**Ejemplo 30 - Metodo para transformar plantas utilizando infiltración al vacío**

15 La transformación de las plantas puede servir como una herramienta vital para establecer la función biológica de un polinucleótido o polipéptido en particular. Por ejemplo, una planta puede ser transformada con un vector capaz de subregular un gen particular a través de regulación antisentido (esto es, el vector puede expresar un transcrito del gen de interés en la dirección antisentido), o el vector puede simplemente ser capaz de sobreexpresar o polipéptido en particular, por ejemplo. Al observar los fenotipos resultantes del transformante, se puede derivar la función proteínica utilizando técnicas conocidas en el arte y descritas en el presente documento. Otros usos para los métodos de transformación se describen a lo largo de este documento.

El siguiente método para transformar materiales vegetales puede ser aplicado a cualquier especie vegetal, aunque es particularmente adecuado para el uso en Arabidopsis.

25 Se cultiva Arabidopsis a 20 °C, 8 horas de luz, 18 °C 16 de oscuridad hasta lo necesario para la transformación. Se fertiliza una vez a la semana de la parte baja. Las plantas pequeñas de aproximadamente 1 por pulgada cuadrada se usan inmediatamente se yerguen. Los días cortos permiten un crecimiento más fuerte vegetativo de la planta e incrementan el rendimiento de semillas.

30 Se transfieren las plantas a 20 °C, 16 horas de luz, 18 °C, 8 horas de oscuridad. Traficantes deberían cribarse rápidamente, y están listas para infiltrar cuando las primeras inflorescencias tienen 10 -15 cm de altura y las inflorescencias secundarias aparecen en la roseta.

35 Entretanto, se transforman los constructos en una cepa de Agrobacterium tumefaciens EHA105 (Koncz y Schell, 1986) (see Direct Agrobacterium Transformation:Freeze-Thaw Method below). Cuando las plantas están listas para transformarse utilizan 1ml de un cultivo cuidado durante la noche para inocular 500 ml de cultivo de medio YEB (matraz de 2L) que contiene el antibiótico apropiado para el constructo y 50 ug/mL de rifampicina (C58 Agro\_ and or 25 mg/mL gentamycin (pMP90)). Se hacen crecer los cultivos durante 2 días a 28 °C a aproximadamente 275 rpm. Más abajo se describe el medio YEB.

40 Cuando OD600 es mayor de 2.0, se centrifuga el cultivo durante 30 minutos, 3500 rpm y se resuspende en 0.5-1.0 ml de medio de infiltración descrito más abajo.

45 Se coloca el cultivo resuspendido en un contenedor con un recipiente en forma de campana grande, y se invierten las macetas que contienen las plantas para ser infiltradas en el medio de infiltración de tal manera que se cubra la planta completa (incluyendo la roseta, pero no demasiado suelo). Se retira cualquier burbuja de aire grande bajo las plantas. Se hace vacío (aproximadamente 700 Hg). Se cierra la succión, y se permite que las plantas reposen bajo vacío durante cinco minutos. Se libera rápidamente la presión de vacío. Se drenan rápidamente las macetas.

50 Las plantas cultivadas infiltradas se colocan a 20 °C, 16 horas de luz, 18 °C, 8 horas de oscuridad. Las plantas se destacan a medida que avanza la criba. Cuando las plantas terminan su florescencia, se recogen las semillas T0.

55 Las semillas se esterilizan y se seleccionan en cuanto a transformantes en el medio selectivo descrito más abajo. Se transfieren las plantas de color verde oscuro (resistente) a una placa de selección secundaria después de una semana de germinación, luego se pasan el suelo durante 6-10 días. Se mantienen los nuestros plantas cubiertos durante varios días.

Medio Para Planta:

	Medio de Infiltración al Vacío	Medio De Selección
Para 1 L		
Sales MS	2.2 g	4.3 g
Vitaminas B5, 1000X	1.0 mL	1.0 mL
Sacarosa	50g	10 g
MES 200mg/ml pH 5.7 con KOH	2.5 ml	2.5 mL
Bencilaminopurina (BAP, 1mg/ml)	44 µl	-

Silweet L-77	200 µl	-
Fitagar	-	8 g

Medio Bactariano	YEP
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Peptona	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
MgSO4	5.0 g

5

El técnico experimentado apreciará que el método de transformación anterior puede ser modificado para ser aplicado a otras especies de plantas. Tal modificación puede incluir la adición de nuevas etapas, la eliminación de cualquier de las etapas descritas, y/o la sustitución de reactivos.

10

Transformación directa de *Agrobacterium*: método de congelación – deshielo.

15

Se hace crecer una cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido auxiliar apropiado Ti en 5 mL de medio YEP (el medio YEP se describe lo largo de este documento) durante la noche a 28 °C. Se añaden 2ml del cultivo nocturno a 50 ml de medio YEP en un matraz de 250ml y se agita vigorosamente (250 rpm) a 28 °C hasta que el cultivo crezca hasta un OD<sub>600</sub> de 0.5 a 1.0. Se congela el cultivo sobre hielo. Se centrifuga la suspensión celular a 3000 g durante 5 minutos a 4 °C.

20

Se descarta la solución sobrenadante. Se resuspenden las células en 1ml de solución de CaCl<sub>2</sub> 20mM (enfriada con hielo). Se dispensan alícuotas de 0.1 mL en tubos Eppendorf pre enfriados. Se añade a aproximadamente 1µg de ADN plásmido a las células.

25

Se congelan las células en nitrógeno líquido. Se deshielan las células incubando el tubo de ensayo en baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Se añade 1mL de medio YEP al tubo y se incuban a 28 °C durante 2-4 horas con oscilación suave. Éste periodo permite que las bacterias expresen los genes resistentes al antibiótico. Se centrifugan los tubos durante 30 segundos en una centrifuga Eppendorf. Se descarta la solución sobrenadante. Se resuspenden las células en 0.1 mL de medio YEP.

30

Se esparcen las células sobre una placa de agar YEP que contiene 3-5 µg/ml de tetraciclina y 10-25 µg/ml de kanamicina. Se incuban la placa a 28 °C. Las colonias transformadas deberían aparecer en 2-3 días.

35

El técnico experimentado apreciaría que el método de transformación anterior puede ser modificado para aplicar a otras especies de plantas. Tal modificación puede incluir la adición de nuevas etapas, la eliminación de cualquiera de las etapas descritas y/o la sustitución de reactivos.

### **Ejemplo 31 – Determinación funcional de las proteínas utilizando perfil de metabolitos.**

40

La presente invención abarca la aplicación del perfil de metabolitos a la identificación de la fusión genética para los polipéptidos de la presente invención. En un ejemplo, las plantas transgénicas podrían producirse de manera que sean incapaces de expresar una proteína de la presente invención, o de manera que tenga niveles de expresión disminuidos de una proteína de la presente invención. Tales plantas transgénicas podrían ser producidas creando constructos bloqueados para inactivar o eliminar el gen endógeno, por ejemplo, utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos a lo largo de este documento. Alternativamente, las plantas transgénicas podrían ser producidas insertando en la planta constructo que exprese los antagonistas de una proteína de la presente invención (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, genes antisentido, anticuerpos, etc.). Otros ejemplos de métodos para producir plantas transgénicas, incluyendo estrategias específicas, son conocidos en la técnica, y algunos de los cuales se describen a lo largo de este documento.

45

50

Una vez que una proteína de la presente invención sea inactiva, o se exprese se inhibe, puede establecerse el perfil de metabolitos resultante de la planta, y la función de la proteína asignada. Algunos de los perfiles metabólicos anticipados para inhibir o inactivar la expresión de una proteína de la presente invención en una planta pueden recordar deficiencias nutricionales conocidas, enfermedades patológicas, tensiones bióticas, o tensiones abióticas, por ejemplo, muchas de las cuales se divulgan a lo largo de este documento. Además, el perfil metabólico de una planta transgénica de la presente invención puede ser útil para identificar las rutas específicas de las cuales el polipéptido de la presente invención es un miembro, además, para identificar los efectores o afectores potenciales

corriente abajo y/o corriente arriba, respectivamente. Además, puede ser posible identificar el modo de acción de un polipéptido en la presente invención.

5 Se conoce un cierto número de métodos en la técnica para identificar el perfil metabólico de una planta. Un ejemplo no limitante es proporcionado por Sauter, H., et al., in "Metabolic Profiling of Plants: A New Diagnostic Technique", Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II, Baker, D.R., Fenyves, J.G., and Moberg, W.K., eds, ACS Symposium Series, 433, Chapter 24, pp.288-299, (1991). En resumen, las plantas transgénicas de la invención, o las plantas en las cuales la expresión de un polipéptido de la presente invención se inhibe o inactiva, se cultivan en cámaras de cultivo. Los brotes son recolectados y congelados inmediatamente hasta el tratamiento posterior. Las muestras de plantas congeladas son pesadas y se añade una cantidad tres veces superior de etanol (P:P). La mezcla se masera entonces en un mezclador y la suspensión resultante se deja durante dos horas para extracción. Las siguientes etapas son filtración, evaporación y sililación con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). También se añaden los alcanos como estándar interno, permitiendo así el cálculo de los coeficientes de retención, así como la cuantificación. La mezcla de cruda se somete entonces a cromatografía de gases sobre una columna capilar sobre goma de metil silicio (30 m DB-1. Temperatura de inyección 230°C. Temperatura del horno 100°-320°C, 4°C/min; 15 min 320°C). Los coeficientes de retención se calculan entonces con respecto a los estándares internos (n-C10H22=1000, n-C28H58=2800).

20 El protocolo anterior puede ser aplicado a numerosas plantas de prueba, además, a los controles. Los datos de los perfiles resultantes se agrupan entre sí (esto es, un grupo de las plantas de prueba, otro grupo de los controles) para llegar a un perfil promedio para cada grupo. En la última etapa, los picos correspondientes (es decir, aquellos picos con igual coeficiente de retención) se agrupan entre sí y las alturas de los picos se someten a análisis estadístico.

25 Las diferencias entre los perfiles metabólicos entre las plantas de prueba y las de control se determinan calculando el "perfil de diferencia" entre los dos grupos. El perfil de diferencia se calcula dividiendo las alturas de los picos. Éste perfil de diferencia proporciona un estimativo semicuantitativo del cambio en magnitud de un metabolito con respecto al otro.

30 Una vez que lo anterior se termina, los picos se asocian entonces con metabolitos particulares (esto es, se determina la identidad de cada pico). Comparando el perfil de metabolito de las proteínas conocidas por modular las rutas específicas en una planta, con los de la presente invención, pueden determinarse pistas para y/o la identificación de la función de un polipéptido de la presente invención. Hay otros métodos conocidos en la técnica, y una o más etapas, pueden sustituirse igualmente por tales métodos.

### 35 **Ejemplo 32 – Determinación funcional de las proteínas utilizando fenotipificación morfológica.**

40 La presente invención abarca la aplicación de fenotipificación morfológica para la identificación de funciones genéticas de los polipéptidos de la presente invención. En un ejemplo, podrían producirse plantas transgénicas que son bien incapaces de expresar una proteína de la presente invención, o que tienen niveles de expresión disminuidos de una proteína de la presente invención. Tales plantas transgénicas podrían ser producidas creando constructos bloqueados para inactivar o eliminar el gen endógeno, por ejemplo, utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos a lo largo de este documento. Alternativamente, las plantas transgénicas podrían producirse insertando una planta a un constructo que exprese los antagonistas de una proteína de la presente invención (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, genes antisentido, anticuerpos, etc.). Otros ejemplos de métodos para la producción de plantas transgénicas, incluyendo estrategias específicas, son conocidos en la técnica y algunos de los cuales se describen a lo largo de este documento.

50 Una vez que una proteína de la presente invención se inactiva, o su expresión se inhibe, puede establecerse el fenotipo morfológico de la planta, y asignarse la función de la proteína. Algunos de los fenotipos anticipados para inhibir o inactivar la expresión de una proteína de la presente invención en una planta pueden recordar deficiencias nutricionales conocidas, enfermedades patológicas, tensiones bióticas o tensiones abióticas, muchas de las cuales se divulgan a lo largo de este documento.

### 55 **Ejemplo 33 – Determinación funcional de las proteínas utilizando tecnología transgenómica (TGT).**

60 La presente invención abarca la aplicación de la tecnología transgenómica (TGY) para la identificación de la función genética de los polipéptidos de la presente invención (Cambia Biosystems, Bellevue, WA). La TGT combina la genómica y la genómica funcional, permitiendo la asociación de secuencias genéticas (por ejemplo las secuencias de polinucleótidos de la presente invención) con fenotipos o rutas específicas. La tecnología se basa en la integración aleatoria de un gen informador [por ejemplo, beta-Glucuronidasa (GUS), BoGUS, GFP] como transposones a través del genoma de una planta (específicamente arroz y Arabidopsis).

65 El transposon puede comprender un vector trampa potenciador que contiene un activador transcripcional y un gen informador capaz de responder a un transactivador. Puesto que la integración es aleatoria, se espera que el transposon pueda integrarse cerca de un elemento regulador del gen- cambiando efectivamente el gen transactivador, la actividad de dicho gen que promueve la activación del gen informador. Así, repitiendo el proceso anterior, puede generarse

una gran población de líneas celulares con patrones de expresión únicos. Estas "líneas patrón" se caracterizan genéticamente en un esfuerzo para seleccionar líneas con patrones de expresión deseados. Las líneas patrón pueden utilizarse para estudios genéticos inversos para identificar líneas con mutaciones en genes de interés y también puede utilizarse como un fondo genético para obtener mutaciones con ganancia de función (GOF) y con pérdida de función (LOF). Además, patrones de expresión novedosa (o con falta de expresión) pueden descubrir novedosos fenotipos y rutas. Además, las líneas patrón que muestran patrones de expresión deseables pueden servir como base genética para dirigir la expresión de genes en tejidos objetivo o en etapas de desarrollo deseadas.

La tecnología TGT descrita más arriba puede utilizarse para identificar la función de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para generar cebadores PCR adecuados para la selección e identificación de líneas celulares marcadas positivamente con la tecnología TGT corriente arriba de un polinucleótido de la presente invención. Una vez identificada, la función de la secuencia de polinucleótidos puede establecerse enlazando los genes de la presente invención marcados con la tecnología TGT con fenotipos o rutas específicas observadas en una línea celular en particular, o un línea patrón. Otra aplicación posible del TGT a los polinucleótidos de la presente invención estaría en apuntar a la expresión genética de polinucleótidos seleccionados de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención flanqueadas por una secuencia reguladora corriente arriba pueden introducirse en líneas patrón que muestran patrones de expresión deseados utilizando técnicas conocidas en el arte de la biología moléculas y descritas a lo largo de este documento.

En la técnica se conoce un número de variaciones de la tecnología anterior y serían apreciadas por al persona experimentada. Por ejemplo, la persona experimentada apreciaría que otros transposones, genes informadores, y secuencias activadoras, etc., podrían ser sustituidas o utilizadas en conjunción con la tecnología TGT. Métodos específicos para aplicar la tecnología TGT pueden encontrarse, por ejemplo, en Wilson KJ, et al., *Microbiol*, 141:1691-1705, (1995), y en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,879,906, 5,599,670, y 5,432,081.

#### **Ejemplo 34 – Análisis del impacto de proteínas recombinantes en la producción de un compuesto de almacenamiento en semillas deseado.**

El efecto de la modificación genética en las plantas de un compuesto de almacenamiento deseado en las semillas (tal como azúcares, lípidos y ácidos grasos) puede establecerse haciendo crecer la planta modificada bajo condiciones adecuadas y analizando las semillas o cualquier otro órgano de la planta en cuanto a la producción incrementada del producto deseado (esto es, un lípido o un ácido graso). Tales técnicas de análisis son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen espectroscopia, cromatografía de capa fina, métodos de tinción de diversas clases, métodos enzimáticos y microbiológicos, y cromatografía analítica tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Ullman 1985, *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A2, pp. 89-90 and 443-613, VCH: Weinheim; Fallon, A. et al. 1987, *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17; Rehm et al., 1993 *Product recovery and purification*, *Biotechnology*, vol. 3, Chapter III, pp. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al., 1988 *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, John Wiley & Sons; Kennedy J.F. & Cabral J.M.S. 1992, *Recovery processes for biological materials*, John Wiley and Sons; Shaeiwitz J.A. & Henry J.D. 1988, *Biochemical separations in: Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Separation and purification techniques in biotechnology*, vol. B3, Chapter 11, pp. 1-27, VCH: Weinheim; and Dechow F.J. 1989).

Además de los métodos antes mencionados, los lípidos de las plantas se extraen a partir del material vegetal tal como lo describe Cahoon et al. (1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 22: 12935-12940) y Browse et al. (1986, *Anal. Biochemistry* 442: 141-145). Qualitative and quantitative lipid or fatty acid analysis is described in Christie, William W., *Advances in Lipid Methodology*. Ayr/Scotland : Oily Press. - (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide* - Ayr, Scotland : Oily Press, 1989 Repr. 1992. - IX,307 S. - (Oily Press Lipid Library ; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford : Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

La prueba inequívoca en cuanto a la presencia de productos de ácidos grasos puede obtenerse mediante el análisis de las plantas transgénicas utilizando procedimientos analíticos estándar: GC, GC-MS o TLC como se describe ampliamente por Christie and references therein (1997 in: *Advances on Lipid Methodology* 4th ed.: Christie, Oily Press, Dundee, pp. 119-169; 1998). Detailed methods are described for leaves by Lemieux et al. (1990, *Theor. Appl. Genet.* 80: 234-240) and for seeds by Focks & Benning(1998, *Plant Physiol.* 118:91-101).

El análisis posicional de la composición de ácidos grasos en las posiciones C-1, C-2 o C-3 del esqueleto glicerol se determina por digestión con lipasa (véase, por ejemplo, Siebertz & Heinz 1977, *Z. Naturforsch.* 32c: 193-205, and Christie 1987, *Lipid Analysis* 2nd Edition, Pergamon Press, Exeter, ISBN 0-08-023791-6).

Una forma típica para recopilar información acerca de la influencia de las actividades incrementadas o disminuidas de las proteínas sobre las rutas biosintéticas de lípidos y azúcares es por ejemplo mediante el análisis de los flujos

de carbono por estudios con marcación con hojas o semillas utilizando  $^{14}\text{C}$ -acetato o  $^{14}\text{C}$ -piruvato (véase, por ejemplo Focks & Benning 1998, *Plant Physiol.* 118: 91-101; Eccleston & Ohlrogge 1998, *Plant Cell* 10: 613-621). La distribución del carbono 14 en lípidos y componentes solubles en agua puede determinarse por conteo de centelleo de líquidos después de la separación respectiva (por ejemplo sobre placas de TLC) incluyendo estándares tales como  $^{14}\text{C}$ -sacarosa y  $^{14}\text{C}$ -malato (Eccleston & Ohlrogge 1998, *Plant Cell* 10: 613-621).

El material que se va a analizar puede ser desintegrado por sonicación, molienda con vidrio, nitrógeno líquido o trituración o a través de otros métodos aplicables. El material tiene que ser centrifugado después de la desintegración. El segmento se resuspende en agua destilada, se calienta durante 10 minutos a  $100^\circ\text{C}$ , se enfría sobre hielo y se centrifuga de nuevo seguido por extracción en ácido sulfúrico 0.5M en metanol que contiene 2% de dimetoxipropano durante 1 hora a  $90^\circ\text{C}$  llevando a compuestos de aceite y lípidos hidrolizados que dan como resultado lípidos transmetilados. Estos éteres de metilo de ácidos grasos se extraen con éter de petróleo, y finalmente se someten a análisis por GC utilizando una columna capilar Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0.32 mm) a un gradiente de temperatura entre  $170^\circ\text{C}$  y  $420^\circ\text{C}$  durante 20 minutos y 5 minutos a  $240^\circ\text{C}$ . La identidad de los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes se define mediante el uso de estándares disponibles de fuentes comerciales (esto es, sigma).

En el caso de ácidos grasos donde los estándares no son disponibles, la identidad de la molécula se muestra a través de formación de derivados y subsecuente análisis por GC-MS. Por ejemplo, la localización de ácidos grasos con triples enlaces se muestra a través GC-MS después de formación de derivados a través de derivados 4,4-Dimetoxi-oxazolina (Christie, Oily Press, Dundee, 1998).

Un método estándar común para analizar azúcares, especialmente algodón, ha sido publicado por Stitt M., Lilley R.Mc.C., Gerhardt R. and Heldt M.W. (1989, "Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves" *Methods Enzymol.* 174: 518-552; para otros métodos véase también Härtel et al. 1998, *Plant Physiol. Biochem.* 36: 407-417 and Focks & Benning 1998, *Plant Physiol.* 118: 91-101).

Para la extracción de azúcares solubles y almidón, se homogenizan 50 semillas en 500ul de etanol al 80% (v/v) en un tubo de ensayo de polipropileno de 1.5ml y se incuban a  $70^\circ\text{C}$  durante 90 minutos. Después de centrifugación a 16000 g durante 5 minutos, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de ensayo. La pella se extrae dos veces con 500ul de etanol al 80%. El solvente de los sobrenadantes combinados se evapora a temperatura ambiente bajo vacío. El residuo se disuelve en 50ul de agua representando la fracción de carbohidratos solubles. La pella restante de la extracción con etanol, que contiene los carbohidratos insolubles tales como almidón, se homogeniza en 200ul de KOH 0.2N y la suspensión se incuba a  $95^\circ\text{C}$  durante una hora para disolver el almidón. Después de la adición de 35ul de ácido acético 1 N y centrifugación durante 5 minutos a 16000g, el sobrenadante se utiliza para la cuantificación del almidón.

Para cuantificar los azúcares solubles, se añaden 10ul de el extracto de azúcar a 990ul del regulador de reacción que contiene 100 mM de imidazol, pH 6.9, 5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de NADP, 1 mM de ATP, y 2 unidades de glucosa-6-P-deshidrogenasa  $2\text{ml}^{-1}$ . Para la determinación enzimática de glucosa, fructosa y sacarosa, se añaden 4.5 unidades de hexoquinasa, 1 unidad de fosfoglucoisomerasa y 2ul de una solución de fructosidasa saturada en sucesión. La producción del NADPH se monitorea fotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. De la misma forma, se prueba el almidón en 30ul de la fracción insoluble de carbohidratos con un kit de Boehringer Mannheim.

Un ejemplo para el análisis del contenido de proteína en hojas y semillas pueden encontrarse en Bradford M.M. (1976, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding" *Anal. Biochem.* 72: 248-254). Para la cuantificación de la proteína total en semillas, se homogenizan 15-20 semillas en 250ul de acetona en un tubo de ensayo de polipropileno de 1.5ml. Después de extracción a 16000 g, el sobrenadante se descarta y la pella secada al vacío se resuspende en 250ul del regulador de extracción que contiene 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, NaCl 250 mM, EDTA 1mM y 1%(p/v) de SDS. Después de la incubación durante 2 horas a  $25^\circ\text{C}$ , el homogenizado se centrifuga a 1600 g durante 5 minutos y se utilizan 200ml del sobrenadante para las mediciones de proteínas. En la prueba se utiliza  $\gamma$ -globulina para calibración. Para las mediciones de proteína se utiliza la prueba de proteína Lowry DC (Bio-Rad) o la prueba de Bradford (Bio-Rad).

Las pruebas enzimáticas de la hexoquinasa y la fructoquinasa se llevan a cabo espectrofotométricamente de acuerdo con Renz et al. (1993, *Planta* 190: 156-165), de fosfoglucoisomerasa, 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP, 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa, glicerol-3-P-deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y pirovato quinasa las cuales se llevan a cabo de acuerdo con Burrell et al. (1994, *Plant* 194: 95-101) and of UDP-Glucose-pyrophosphorylase according to Zrenner et al. (1995, *Plant J.* 7: 97-107).

Los intermedios del metabolismo de los carbohidratos, tales como glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, fosfoenilpiruvato, piruvato y ATP se miden tal como lo describe Härtel et al. (1998, *Plant Physiol. Biochem.* 36: 407-417) and metabolites are measured as described in Jelitto et al. (1992, *Planta* 188: 238-244).

5 Además de la medición del compuesto final de almacenamiento en semilla (esto es, lípidos, almidón o proteína de almacenamiento), también es posible analizar otros componentes de las rutas metabólicas utilizadas para la producción de un compuesto de almacenamiento en semillas deseado, tal como intermedios y productos colaterales, para determinar la eficiencia global de producción del compuesto (Fiehn et al. 2000, Nature Biotech. 18: 1447-1161).

10 Por ejemplo, los vectores de expresión en levadura que contienen los ácidos nucleicos divulgados aquí, o fragmentos de los mismos, pueden ser construidos y transformados en *Saccromycetes cerevisie* utilizando protocolos estándar. Las células transgénicas resultantes pueden entonces probarse en cuanto a alteraciones en contenidos de azúcar, aceite, lípidos o ácidos grasos.

15 De la misma forma, los vectores de expresión en plantas que comprende los ácidos nucleicos divulgados aquí, o fragmentos de los mismos, pueden ser construidos y transformados en una célula vegetal apropiada tal como *Arabidopsis*, soja, colza, maíz, trigo, *Medicago truncatula*, etc., utilizando protocolos estándar. Las células y/o plantas transgénicas resultantes derivadas de las mismas pueden ser entonces probadas en cuanto a alteraciones en contenidos de azúcar, aceite, lípidos o ácidos grasos.

20 Adicionalmente, las secuencias divulgadas aquí, o fragmentos de las mismas, pueden ser utilizadas para generar mutaciones bloqueadas en los genomas de diversos organismos, tales como bacterias, células de mamíferos, células de levadura, y células vegetales (Girke et al. 1998, Plant J. 15: 39-48). Las células bloqueadas resultantes pueden ser evaluadas en cuanto a su composición y contenido en compuestos almacenados en semillas, y el efecto del fenotipo y/o genotipo de la mutación. Para otros métodos de inactivación genética inclúyase US 6004804 "Non-Chimeric Mutational Vectors" and Puttaraju et al. (1999, "Spliceosome-mediated RNA transsplicing as a tool for gene therapy" Nature Biotech. 17:246-252).

25

## REIVINDICACIONES

- 5
1. Un ácido nucleico aislado que codifica prenil proteasa, donde el ácido nucleico comprende un polinucleótido seleccionado del grupo consistente de:
- 10
- a) un polinucleótido de SEQ ID NO:7  
 b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 8;  
 c) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad en secuencia con la secuencia nucleótidos de SEQ ID NO: 7.  
 d) Un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO:8 y  
 e) un polinucleótido complementario a un polinucleótido de cualquiera de a) hasta d).
- 15
2. El ácido nucleico que codifica la prenil proteasa de la reivindicación uno, donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que funciona en la farnesilación de la proteína.
3. Un ácido nucleico aislado que hibridiza bajo condiciones restrictivas a un polinucleótido complementario a la secuencia de SEQ ID NO: 7, donde el ácido nucleico codifica una prenil proteasa.
- 20
4. Un vector o casete de expresión que comprende un ácido nucleico de 1 a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.
5. Una célula de planta transgénica que contiene el vector o el casete de expresión de la Reivindicación 4.
- 25
6. Una planta transgénica que comprende una célula de planta de la Reivindicación 5.
7. La planta de la Reivindicación 6, donde la planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.
- 30
8. La planta de la Reivindicación 6 o 7, donde la planta es seleccionada del grupo consistente de maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, manihot, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies de Salix, Palma de aceite, coco, pastos perennes y cultivos de forraje.
- 35
9. Una semilla de planta producida por la planta de la Reivindicación 6, donde la semilla es una variedad verdadera para una tolerancia incrementada a tensión ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la semilla, y la semilla contiene un ácido nucleico introducido como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.
- 40
10. Un método para producir una planta transgénica que contiene un ácido nucleico que codifica prenil proteasa donde la planta tiene una tolerancia incrementada a una tensión ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta que comprende transformar una célula de planta con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico y generar desde la célula de la planta la planta transgénica, donde el ácido nucleico es seleccionado del grupo consistente de:
- 45
- a) Un polinucleótido de SEQ ID NO: 3;  
 b) Un polinucleótido de SEQ ID NO: 5;  
 c) Un polinucleótido de SEQ ID NO: 7;  
 d) Un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 4;  
 e) Un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 6;  
 50
- f) Un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 8;  
 g) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,5 o 7;  
 h) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 4, 6 o 8 y  
 55
- i) un polinucleótido complementario a un polinucleótido de cualquiera de a) hasta h).
11. El método de la Reivindicación 10, donde el estrés ambiental es seleccionado del grupo consistente de alta salinidad, sequía y temperatura.
- 60
12. El método de la Reivindicación 10 o 11, donde la planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.

- 5
13. El método de la Reivindicación 10, 11, o 12, donde la planta es seleccionada del grupo consistente de: trigo, centeno, avena, tritical, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, colza, canola, manihot, pimienta, girasol, tagetes, plantas solanáceas, patata, tabaco, berenjena, tomate, especies de Vicia, guisantes, alfalfa, café, cacao, té, especies de Salix, Palma de aceite, coco, pastos perennes y un cultivo de forrage.
- 10
14. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 13, donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que funciona en la farnesilación.
- 15
15. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 14, donde dicho ácido nucleico está enlazado operativamente a un promotor que dirige la expresión del ácido nucleico.
16. El método de la Reivindicación 15, donde el promotor es específico para el tejido o está regulado en función del desarrollo.
- 15
17. Uso del ácido nucleico de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, el vector o el casete de expresión de la Reivindicación 4, la célula de planta de la Reivindicación 5, la planta de cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8 o la semilla de planta de la Reivindicación 9 para la producción de una planta que tiene una tolerancia incrementada a un estrés ambiental.

20

Figura 1

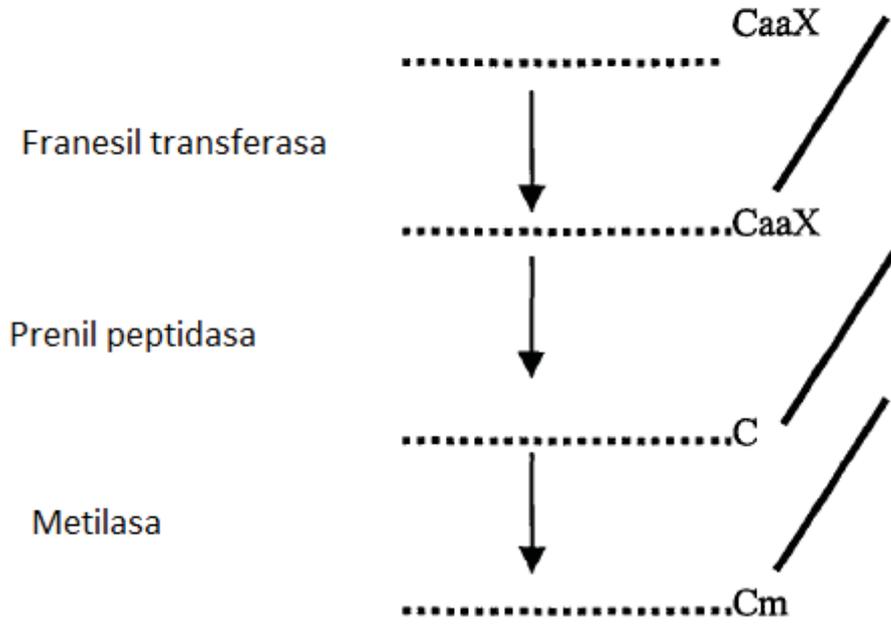


Figura 2

GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGCTCAAGCTGTCCAATCTGCCAGCGCCTCTCAAGGG  
 AATAGTTAGTCAAGAGAAAATTTGAGAAAAGCGCAGGCGTACAGCTTAGACAAGAGCCGATTCCATTTT  
 GTGCACGCGGCTGTGAATATCGTGGAGGAATCGGCAATTCCTCTGCTGGGGTTGTTGCCGTGGGCGTG  
 GGATAAGAGTGGATCGTTAGTAGGGAAGCTAGGGTTTATGATGAGAAGAGCGAAAATTTTGCAGACGCTT  
 TCTTTTCTTGCGGTGACCACGTTGTGGTCGCAGATACTTGAGCTTCCATTCTCGCTCTACTCCACGTTT  
 GTCATCGAGGCCC GCCATGGCTTCAACAAGCAAACCATATGGTTGTTTTTACGGGATATGATCATGGG  
 GCTGGCTCTCATGATGGTGGTTGGCCACCCATAGTGTGCGCAATTATCTATATTGTGCAGAACGGTG  
 GGCCATATCTTGCCCTCTATCTGTGGGCCTTTATGTTGCTGTTATCCCTCGTGTTGATGGCCCTATATC  
 CCGTTCTCATCGCGCTCTTTTCAACACATTACACCCTTGCCAGAAGGGCAGCTTCGTGCCAAGATC  
 GAGAAGCTGGCATCCTCCTTGGACTTCCATTGAAGAAATTGTTTGAATTGACGGTTCTACTCGGTC  
 AAGCCATAGCAACGCCTACATGTATGGATTTTACAACAGCAAGCGCATCGTTCTGTACGACACTCTA  
 ATATCGCAATGTAAGAATGAGGAAGAAGTAGTGGCAGTTATAGCTCATGAGCTTGGCCATTGGAAGC  
 TGAGCCACACTATGTA CTGTTCCCTGGCCATGCAGGTGCTTACACTGTTGCAATTCGGAGGCTATACG  
 CTTGTTTCGGA ACTCTAGTGGCCTGTTTTGAGCTTCGGTTTCTCCACACAGCCAGTGCTTATCGGGCTG  
 ATCCTATTCAGCACACTATTATGCCCTTCCATCATCTTGTAAGCTTTGCTCTCAACCTGTTGAGCCGA  
 GCCTTCGAATTT CAGGCGGATGCGTTCGCCCGCTCATTAGGGTACAGAGAGCCATTGAGAGCTGGCC  
 TGATCAAGCTGCAGGAGGAGAATCTGTCTGCCATGAACACGGATCCGTGGTATTTCAGCGTATCATCA  
 TTCACACCCCCCGCTTGTGAGCGATTGCAAGCTCTTGATGAAACGTCCAAGAAAACGGATTAGAAC  
 TTACCCCCTTCGGACCGTAGTTGAGATTTGTAGGAATATAGCTTCTTCAGGAGAAAAGAAACAAAATG  
 AGCTATGTCCTAGCACATCCACTGTAGAATTCACTGATGAATGACGAATAGTACATGAACACTCATT  
 TTTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGGCCCGGTACCC (SEQ ID NO:1)

Figura 3

LKLSNLPAPL KGIVSQEKFE KAQAYSLDKS RFHFVHAAVN IVEESAILLL GLLPWAWDKS  
 GSLVGKLGFD EKSEILQTLS FLAVTTLWSQ ILELPFSLYS TFVIEARHGF NKQTIWFLR  
 DMIMGLALMM VVGPPIVSAI IYIVQNGGPY LALYLWAFML LLSLVLMALY PVLIAPLNT  
 FTPLPEGQLR AKIEKLASSL DFPLKCLFVI DGSTRSSHSN AYMFGFYNSK RIVLYDTLIS QCKNEEEVVA  
 VIAHELGHWK LSHTMYSFLA MQVLTLLQFG GYTLVRNSSG LFLSFGFSTQ PVLIGLILFQ  
 HTIMPFHHLV SFALNLLSRA FEFQADAFAR SLGYREPLRA GLIKLQEENL SAMNTDPWYS  
 AYHSHSPLV ERLQALDETS KKTD\* (SEQ ID NO:2)

## Figura 4

ATGGCGATTCCCTTTCATGGAAACCGTCGTGGGTTTTATGATAGTGATGTACATTTTT  
GAGACGTATTTGGATCTGAGGCAACTCACTGCTCTCAAGCTTCCAACCTCTCCCGAA  
AACCTTGGTTGGTGTAAATTAGCCAAGAGAAGTTTGAGAAATCACGAGCATAACAGTC  
TTGACAAAAGCTATTTTCACTTTGTTTCATGAGTTTGTAACCTATACTTATGGACTCTG  
CAATTTTGTTCCTTGGGATCTTGCCTTGGTTTTGGAAGATGTCTGGAGCTGTTTTACC  
GAGGTTGGGCCTTGATCCAGAGAATGAAATACTGCATACTCTTTCATTCTTGGCTGG  
TGTTATGACATGGTCACAGATCACTGATTTGCCATTTTCTTTGTACTCAACTTTCGTG  
ATCGAGTCTCGGCATGGGTTCAACAAACAACAATATGGATGTTTATTAGGGACAT  
GATCAAAGGAACATTCCCTCTCTGTCATACTAGGCCACCCATTGTTGCCGCGATAAT  
TTTCATAGTCCAGAAAGGAGGTCCTTATCTTGCCATCTATCTGTGGGCATTCATGTT  
TATCCTGTCTCTAGTGATGATGACTATATACCCGGTCTTGATAGCACCGCTCTTCAA  
CAAGTTCACTCCTCTTCCAGATGGAGACCTCCGGGAGAAGATTGAGAACTTGCTT  
CTTCTCTAAAGTTTCCTTTGAAGAAGCTGTTTGTGTCGATGGATCTACAAGGTCAA  
GCCATAGCAATGCTTACATGTATGGTTTCTTTAAGAACAAAAGGATTGTTCTTTATG  
ATACGTTGATTGAGCAGTGCAAGAATGAGGATGAAATTGTGGCGGTTATTGCACAC  
GAGCTTGGACATTGGAAACTGAATCACACTACATACTCGTTCATTGCAGTTCAAAT  
CCTTGCCTTCTTACAATTTGGAGGATACACTCTTGTGTCAGAACTCCACTGATCTCTT  
CAGGAGTTTCGGATTTGATACACAGCCTGTTCTCATTGGTTTGATCATATTTTCAGCA  
CACTGTAATACCACTGCAACATCCAGTAAGCTTTGGCCTCAACCTTGTTAGTCGAGC  
GTTTGAGTTTCAGGCTGATGCTTTTGCTGTGAAGCTTGGCTATGCAAAAGATCTTCG  
TCCTACTCTAGTGAAACTACAGGAAGAGAAGTTATCAGCAATGAATACTGATCCAT  
TGTACTCAGCTTATCACTACTCACATCCTCCTCTTGTGAAAGGCTTCGAGCCATTG  
ATGGAGAAGACAAGAAGACAGATTAA (SEQ ID NO:3)

**Figura 5**

MAIPFMETVVGFMIVMYIFETYLDLRQLTALKLPTLPKTLVGVISQEKFEKSRAYSLDK  
SYFHFVHEFVTILMDSAILFFGILPFWKMSGAVLPRLGLDPENEILHTLSFLAGVMTW  
SQITDLPFSLYSTFVIESRHGFNKQTIWFMFIRDMIKGTFLSVILGPPIVA AIIIFIVQKGGPYL  
AIYLWAFMFILSLVMMTIYPVLIAPLFNKFTPLPDGDLREKIEKLASSLKFP LKKLFVVD  
GSTRSSHSNAYMYGFFKNKRIVLYDTLIQQCKNEDEIVAVIAHELGHWKLNHTTYSFIA  
VQILAF LQFGGYTLVRNSTDLFRSFGFDTQPVLIGLIIFQHTVIPLQHPVSFGLNLVSR AF  
EFQADAF AVKLG YAKDLRPTLVKLQEENLSAMNTDPLYSAYHYSH PPLVERLRAIDGE  
DKKTD\* (SEQ ID NO:4)

**Figura 6**

ATGGCGATTCTTTTCATGGAAACCGTCGTGGGTTTTATGATAGTGATGTACATTTTT  
GAGACGTATTTGGATCTGAGGCAACTCACTGCTCTCAAGCTTCCAACCTCTCCCGAA  
AACCTTGGTTGGTGTAAATTAGCCAAGAGAAGTTTTGAGAAATCACGAGCATACAGTC  
TTGACAAAAGCTATTTTCACTTTGTTTCATGAGTTTTGTAACATACTTATGGACTCTG  
CAATTTTGTCTTTGGGATCTTGCCTTGGTTTTGGAAGATGTCTGGAGCAGTTTTAC  
CGAGTTGGGCCTTGATCCAGAGAATGAAATACTGCATACTCTTTCATTCTTGGCTG  
GTGTTATGACATGGTCACAGATCACTGATTTGCCATTTTCTTGTACTCAACTTTCGT  
GATCGAGTCTCGGCATGGGTTCAACAAACAACAATATGGATGTTTCATTAGGGACA  
TGATCAAAGGAACATTCCTCTCTGTCATACTAGGCCACCCATTGTTGCTGCGATAA  
TTTTCATAGTCCAGAAAGGAGGTCTTATCTTGCCATCTATCTGTGGGCATTCATGT  
TTATCCTGTCTCTAGTGATGATGACTATATACCCGGTCTTGATAGCACCGCTCTTCA  
ACAAGTTCCTCTTCCAGATGGAGACCTCCGGGAGAAGATTGAGAACTTGCT  
TCTTCTCTAAAGTTTTCTTTGAAGAAGCTGTTTGTGTCGATGGATCTACAAGGTCA  
AGCCATAGCAATGCTTACATGTATGGTTTCTTTAAGAACAAAAGGATTGTTCTTTAT  
GATACGTTGATTCAGCAGTGCAAGAATGAGGATGAAATTGTGGCGGTTATTGCACA  
CGAGCTTGGACATTGGAAACTGAATCACACTACATACTCGTTCATTGCAGTTCAA  
TCCTTGCCTTCTTACAATTTGGAGGATACTCTTGTGAGAACTCCACTGATCTCT  
TCAGGAGTTTCGGATTTGATACACAGCCTGTTCTCATTGGTTTGATCATATTTGAGC  
AACTGTAATACCACTGCAACATCTAGTAAGCTTTGGCCTGAACCTCGTTAGTCGA  
GCGTTTGAGTTTCAGGCTGATGCTTTTGTGCTGTGAAGCTTGGCTATGCAAAAAGATCTT  
CGTCCTGCTCTAGTGAAACTACAGGAAGAGAACTTATCAGCAATGAACACTGATCT  
ATTGACTCAGCTTATCACTACTCACATCCTCCTTGTGAAAGGCTTCGAGCCAT  
TGATGGAGAAGACAAGAAGACAGATTAA (SEQ ID NO:5)

**Figura 7**

MAIPFMETVVGFMIVMYIFETYLDLRQLTALKLPTLPKTLVGVISQEKFESRAYSLDK  
SYFHFVHEFVTILMDSAILFFGILPFWKMSGAVLPRLGLDPENEILHTLSFLAGVMTW  
SQITDLPFSLYSTFVIESRHGFNKQTIWFMFIRDMIKGTFLSVILGPPIVAIIIFIVQKGGPYL  
AIYLWAFMFILSLVMMTIYPVLIAPLFNKFTPLPDGDLREKIEKLASSLKFPKLLFVVD  
GSTRSSHSNAYMYGFFKNKRIVLYDTLIQQCKNEDEIVAVIAHELGHWKLNHTTYSFIA  
VQILAFQGGYTLVRNSTDLFRSFGFDTQPVLIGLIIFQHTVIPLQHLVSFGLNLVSRAF  
EFQADAFVAVKLGAKDLRPAVVKLQEENLSAMNTDLLYSAYHYSHPPPLVERLRAIDGE  
DKKTD\* (SEQ ID NO:6)

## Figura 8

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGGG  
AGACGCATGGTTCTGAACTAATTGTTATAAATAATACCTAAAATTTGAGTTGTCCT  
AAACATTGGGGTTTAAACAAATCCAATCTCTCAATATAAAACCCAATGATCTCACC  
CTCACTCCGTTTCTGATTTCTCACTCTTCGTTTCTCGTTCGGTTCATCAGCGTGTGTC  
TCAGCCATGGCGTTTCCCTACATGGAAGCCGTTGTCGGATTTATGATATTAATGTAC  
ATTTTGAACCTTACTTGGATGTGCGACAACATAGGGCCCTCAAACCTCCTACTCTT  
CCAAAGACTTTAGAAGGTGTTATCAGCCAAGAGAAATTTGAGAAATCTAGAGCCTA  
TAGTCTTGATAAAAGCCACTTCCATTTTGTTCACGAGTTTGTGACAATAGTGACAGA  
CTCTACAATTTTGTACTTTGGGGTATTGCCCTGGTTTTGGAAGAAATCAGGAGATTT  
TATGACAATAGCTGGTTTCAATGCTGAGAATGAAATACTGCATACCCTTGCCTTCTT  
AGCAGGGCTGATGATTTGGTCACAGATAACAGATTTGCCCTTTTCTCTGTACTCAAC  
TTTTGTGATTGAGGCCCGTCATGGTTTTAATAAGCAAACACCATGGTTATTCTTTAG  
GGACATGCTTAAAGGAATTTTCTTTCCGTAATAATTGGTCCACCTATTGTGGCTGC  
AATCATTGTAATAGTACAGAAAGGAGGTCCATACTTGGCCATCTATCTTTGGGTTTT  
TACGTTTGGTCTTTCTATTGTGATGATGACCCTTATCCAGTACTAATAGCTCCACTC  
TTCAATAAGTTCACTCCACTTCCAGATGGTCAACTCAGGGAGAAAATCGAGAACT  
TGCTTCCCTCCCTCAACTATCCGTTAAAGAACTATTTGTTGTCGATGGATCCACAAG  
ATCAAGTCACAGCAATGCCTATATGTATGGATTCTTCAAGAACAAGAGGATTGTCC  
TTTATGACACATTAATTCAACAGTGCAAAGACGATGAGGAAATTGTTGCTGTTATT  
GCCATGAGTTGGGACACTGGAAGCTCAACCATACTGTGTACACATTTGTTGCTAT  
GCAGATTCTTACACTTCTACAATTTGGAGGATATACTAGTGCGAAATTCAGCTG  
ATCTGTATCGAAGCTTTGGGTTTGATACGCAGCCAGTCCTCATTGGGCTCATCATAT  
TTCAGCATACTGTAATCCCCTTCAGCAATTGGTCAGCTTTGGTCTGAACCTAGTCA  
GCCGATCATTGAAATTCAGGCTGATGGCTTTGCCAAGAAGCTTGGATATGCATCTG  
GATTACGCGGTGGTCTTGTGAAACTACAGGAGGAGAATCTGTCAGCTATGAATACA  
GATCCTTGCTCGTGCCG (SEQ ID NO:7)

**Figura 9**

MAFPYMEAVVGF MILMYIFETYLDVRQHRALKLPTLPKTLEGVISQEKFEKSRAYSLD  
KSHFHFVHEFVTIVTDSTILYFGVLPWFWKKSGDFMTIAGFNAENEILHTLAFLAGLMI  
WSQITDLPFSLYSTFVIEARHGFNKQTPWLFFRDMLKGIFLSVIIGPPIVA AIIIVIVQKGGP  
YLAIYLWVFTFGLSIVMMTLYPVLIAPLFNKFTPLPDGQLREKIEKLASSLNYPLKKLFV  
VDGSTRSSHSNAYMYGFFKNKRIVLYDTLIQQCKDDEEIVAVIAHELGHWKLNHTVYT  
FVAMQILTLLQFGGYTLVRNSADLYRSFGFDTQPVLIGLIIFQHTVIPLQQLVSFGLNLVS  
RSFEFQADGFAKKLGYASGLRGGLVKLQEENLSAMNTDPCSC (SEQ ID NO:8)

**Figura 10**

ACGAGGCTGAGTGCTGAGAATGAGATAATACACACCCTTGCTTTCTTAGCTGGTTC  
CATGGTTTGGTCGCAGATTACAGACTTGCCGTTCTCTCTCTATTCAACTTTTGTTATA  
GAGGCTCGACATGGTTTTAACAAGCAAACCTATATGGCTCTTCATTAGGGATATGAT  
CAAAGGAATTTACTATCCATGATATTGGGGCCACCAATCGTGGCTGCTATCATCTA  
CATAGTACAGATTGGAGGACCTTACCTGGCTATATATCTCTGGGGTTTTATGTTTGT  
ATTAGCTCTACTGATGATGACAATATACCCCATTTGTGATAGCTCCTCTGTTCAACAA  
GTTCACTCCTCTTCCTGAAGGAGTCCTCAGGGAAAAAATAGAGAAGCTGGCAGCTT  
CCCTCAAGTTTCTTTGAAAAAGCTTTTCGTGGTAGATGGGTCTACCAGATCAAGCC  
ACAGTAATGCCTACATGTATGGTTTTTTCAAGAACAAGCGCATAGTACTCTATGAC  
ACATTGATTCAGCAGTGTAGCAATGAGGATGAGATAGTTTCTGTTATAGCACATGA  
ACTTGGACACTGGAACTCAATCATACTGTCTATTCCCTTGTAGCTGTCCAGCTGCT  
TATGTTTCTTCAATTTGGAGGATATACTCTAGTAAGGAGCTCCAAAGATCTATTTGG  
AAGTTTTGGCTTCAAGGACCAGCCAGTAATAATTGGATTGATCATTTTCCCGCACAC  
CATAATACCCATCCAACACCTTCTGAGCTTTCGCCTGAACCTTGTCAGCAGAGCATT  
TGAATTCAGGCTGATGCCTTTGCCAAGAACCTTGGATATGCCCTCAGCTCCGAGC  
AGCCCTTGTTAAACTACAGGAGGAGAACTTGTCTGCGATGAACACCGATCCTTGGT  
ATTCGGCATATCACTACTCCCACCCACCACTCGTCGAGAGGCTGCAAGCTTTGGAA  
GATTCAGACGACAAAAAAGAAGATTAGTCGATCCTTGTATGAGGTTTACATATGGA  
TTTTTCCCTGCCACATGCACACCGATTCAAGTCTTGGATGGTGAGGGTTTTGACATA  
GGAGTGTGTCAAAGCTTTAGAGTGCATCTTTCGGTCAGGTGCAACAGCCTTTCGGT  
CATTGAGACATATAAGCGAATTAGCTATTAACAAAAAACAGAACTGTTGCATCAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAGTGCTCTGCGTTGTTACCACTGCTTGCCCTATAGTGATCGTATC  
AGA (SEQ ID NO:9)

**Figura 11**

TRLSAENEIIIHTLAFLAGSMVWSQITDLPFSLYSTFVIEARHGFNKQTIWLFIRDMIKGIL  
LSMILGPPIVAIIYIVQIGGPYLAIYLWGFMFVLALLMMTIYPIVIAPLFNKFTPLPEGVL  
REKIEKLAASLKFPKLFVVDGSTRSSHSNAYMYGFFKNKRIVLYDTLIQQCSNEDEIV  
SVIAHELGHWKLNHTVYSFVAVQLLMFLQFGGYTLVRSSKDLFGSFGFKDQPVIIGLIIF  
PHTIPIQHLLSFRLNLVSRAFEFQADAFKNLGYAPQLRAALVKLQEENLSAMNTDPW  
YSAYHYSHPLVERLQALEDSDDKKED\* (SEQ ID NO:10)

Figura 12A

```

                                     1                               40
yeast-PP(SEQ ID NO:27)(1) ----MFDLKTILDHPNIPWKLIIISGFSIAQFSFESYLTYR
  SEQ ID NO:8      (1) -----MAFPYMEAVVGFMIILMYIFETYLDVR
  SEQ ID NO:2      (1) -----
  SEQ ID NO:10     (1) -----
human-PP(SEQ ID NO:25)(1) MGMWASLDALWEMPAKKRIFGAVLLFSWTVYLVWETFLAQR
  SEQ ID NO:4      (1) -----MAIPFMETVVGFMIIVMYIFETYLDLR
  SEQ ID NO:6      (1) -----MAIPFMETVVGFMIIVMYIFETYLDLR

                                     41                               80
  yeast-PP      (37) QYQKLSETK-LPPVLEDEIDDETFHKSRNYSRAKAKFSIF
  SEQ ID NO:8   (27) QHRALKLPT-LPKTLEGVISQEKFEKSRAYS�DKSHFHFV
  SEQ ID NO:2   (1) ----LKLSN-LPAPLKGIVSQEKFEKAQAYS�DKSRFHFV
  SEQ ID NO:10  (1) -----
  human-PP     (41) QRRYKTTTHVPELGGIMDSETFEKSRLYQLDKSTFSFW
  SEQ ID NO:4   (27) QLTALKLPT-LPKTLVGVISQEKFEKSRAYS�DKSYFHFV
  SEQ ID NO:6   (27) QLTALKLPT-LPKTLVGVISQEKFEKSRAYS�DKSYFHFV

                                     81                               120
  yeast-PP     (76) GDVYNLAQKLVFIKYDLFPKIWHMAVSLNNAVLVRFHVM
  SEQ ID NO:8   (66) HEFVTIVTDSTILYFGVLPWFWKMSG---DFMTIAGFNAE
  SEQ ID NO:2   (36) HAAVNIVEESAILLLGLLPWAWDKSG---SLVGKLGDFEK
  SEQ ID NO:10  (1) -----TRLSAE
  human-PP     (81) SGLYSETEGTLILLFGGIPYLWRLSG---RFCGYAGFGPE
  SEQ ID NO:4   (66) HEFVTILMDSAILFFGILPWFWKMSG---AVLPRLGLDPE
  SEQ ID NO:6   (66) HEFVTILMDSAILFFGILPWFWKMSG---AVLPRLGLDPE

                                     121                               160
  yeast-PP     (116) STVAQSLCFLGLLSSLSTLVDLPLSYSHFVLEEKFGFNK
  SEQ ID NO:8   (103) NEILHTLAFLAGLMIWSQITDLPFSLYSTFVIEARHGFNK
  SEQ ID NO:2   (73) SEILQTL SFLAVTTLWSQILELPFSLYSTFVIEARHGFNK
  SEQ ID NO:10  (7)  NEIIHTLAFLAGSMVWSQITDLPFSLYSTFVIEARHGFNK
  human-PP     (118) YEITQSLVFLLLATLFSALTGLPWSLYNTFVIEEKHGFNQ
  SEQ ID NO:4   (103) NEILHTLSFLAGVMTWSQITDLPFSLYSTFVIESRHGFNK
  SEQ ID NO:6   (103) NEILHTLSFLAGVMTWSQITDLPFSLYSTFVIESRHGFNK

```

Figura 12B

		161	200
yeast-PP	(156)	LTVQLWITDMIKSLTLAYAIGGPILYLFLKIFDKFPTDFL	
SEQ ID NO:8	(143)	QTPWLFFRDMLKGIFLSVIIGPPIVAAIIVIVQKGGPYLA	
SEQ ID NO:2	(113)	QTIWLFRLDMIMGLALMMVVGPPIVSAIIYIVQNGGPYLA	
SEQ ID NO:10	(47)	QTIWLFIRDMIKGILLSMILGPPIVAIIYIVQIGGPYLA	
human-PP	(158)	QTLGFFMKDAIKKFVVTQCILLPVSSLLLYIIKIGGDYFF	
SEQ ID NO:4	(143)	QTIWMFIRDMIKGTFLSVILGPPIVAIIIFIVQKGGPYLA	
SEQ ID NO:6	(143)	QTIWMFIRDMIKGTFLSVILGPPIVAIIIFIVQKGGPYLA	
		201	240
yeast-PP	(196)	WYIMVFLFVVQILAMTIIPVFIMPMPFNKFTPLEDGBLKKK	
SEQ ID NO:8	(183)	IYLWVFTFGLSIVMMTLYPVLIAPLFNKFTPLPDGQLREK	
SEQ ID NO:2	(153)	LYLWAFMLLLSLVLMALYPVLIAPLFNTFTPLPEGQLRAK	
SEQ ID NO:10	(87)	IYLWGFMFVLALLMMTIYPVIVIAPLFNKFTPLPEGVLEK	
human-PP	(198)	IYAWLFTLVVSLVLTIIYADYIAPLFDKFTPLPEGKLEKE	
SEQ ID NO:4	(183)	IYLWAFMFILSLVMMTIYPVLIAPLFNKFTPLPDGDLREK	
SEQ ID NO:6	(183)	IYLWAFMFILSLVMMTIYPVLIAPLFNKFTPLPDGDLREK	
		241	280
yeast-PP	(236)	IESLADRVGFPLDKIFVIDGSKRSSHSNAYFTGLPFTSKR	
SEQ ID NO:8	(223)	IEKLASSLNYPLKCLFVVDGSTRSSHSNAYMYGF-FKNKR	
SEQ ID NO:2	(193)	IEKLASSLDFPLKCLFVIDGSTRSSHSNAYMYGF-YNSKR	
SEQ ID NO:10	(127)	IEKLAASLKFPKCLFVVDGSTRSSHSNAYMYGF-FKNKR	
human-PP	(238)	IEVMAKSIDFPLTKVYVVEGSKRSSHSNAYPYGF-FKNKR	
SEQ ID NO:4	(223)	IEKLASSLKFPKCLFVVDGSTRSSHSNAYMYGF-FKNKR	
SEQ ID NO:6	(223)	IEKLASSLKFPKCLFVVDGSTRSSHSNAYMYGF-FKNKR	
		281	320
yeast-PP	(276)	IVLFDTLVNSNSTD-----	
SEQ ID NO:8	(262)	IVLYDTLIQQCKDD-----	
SEQ ID NO:2	(232)	IVLYDTLISQCKNE-----	
SEQ ID NO:10	(166)	IVLYDTLIQQCSNE-----	
human-PP	(277)	IVLFDTLLEEYSVLNKKDIQEDSGMEPRNEEEGNSEEIKAK	
SEQ ID NO:4	(262)	IVLYDTLIQQCKNE-----	
SEQ ID NO:6	(262)	IVLYDTLIQQCKNE-----	

Figura 12C

```

                                321                                360
yeast-PP (290) -----EITAVLAHEIIGHWQKNHIVNMVIFSQ LHT
SEQ ID NO:8 (276) -----EEIVAVIAHEIIGHWKLNHTVYTFVAMQILT
SEQ ID NO:2 (246) -----EEVVAVIAHEIIGHWKL SHTMYSFLAMQVLT
SEQ ID NO:10 (180) -----DEIVSVIAHEIIGHWKL NHTVYSFVAVQLLM
human-PP (317) VKNKKQGCKNEEVLAVLGHETIGHWKL GHTVKNI IISQMNS
SEQ ID NO:4 (276) -----DEIVAVIAHEIIGHWKL NHTTYSFIAVQILA
SEQ ID NO:6 (276) -----DEIVAVIAHEIIGHWKL NHTTYSFIAVQILA

                                361                                400
yeast-PP (319) FLIFSLFTSIYRNTSFYNTFGFFLEKSTG SFVDPVITKEF
SEQ ID NO:8 (306) LLQFGGYTLVRNSADLYRSFG-----FDTQ
SEQ ID NO:2 (276) LLQFGGYTLVRNSSGLFLSFG-----FSTQ
SEQ ID NO:10 (210) FLQFGGYTLVRSSKDLFGSFG-----FKDQ
human-PP (357) FLCFFLFAVLIGRKELFAAFGF-----YDSQ
SEQ ID NO:4 (306) FLQFGGYTLVRNSTDLFRSFG-----FDTQ
SEQ ID NO:6 (306) FLQFGGYTLVRNSTDLFRSFG-----FDTQ

                                401                                440
yeast-PP (359) PIIIG-FMLFNDLLTPLECAMQFVMSLISRT HEYQADAYA
SEQ ID NO:8 (331) PVLIG-LIIFQHTVIPLQQLVSFGLNLVSR SFEFQADGFA
SEQ ID NO:2 (301) PVLIG-LILFQHTIMPFHHLVSFALNLLSRA FEFQADAF
SEQ ID NO:10 (235) PVIIG-LIIFPHTIIPIQHLLSFRLNLVSR AFEFQADAF
human-PP (383) PTLIGLLIIFQFIFSPYNEVLSFCLTVLSRR FEFQADAF
SEQ ID NO:4 (331) PVLIG-LIIFQHTVIPLQHPVSFGLNLVSR AFEFQADAF
SEQ ID NO:6 (331) PVLIG-LIIFQHTVIPLQHLVSFGLNLVSR AFEFQADAF

                                441                                480
yeast-PP (398) KKLGYK-----
SEQ ID NO:8 (370) KKLGYASGLRGGLVKLQEENLSAMNTDPCSC-----
SEQ ID NO:2 (340) RSLGYREPLRAGLIKQEENLSAMNTDPWYSAYH HSHPPL
SEQ ID NO:10 (274) KNLGYAPQLRAALVKLQEENLSAMNTDPWYSAYH YSHPPL
human-PP (423) KKL GKAKDLYSALIKLNKDNLGFVSDWLFSPMWHY SHPPL
SEQ ID NO:4 (370) VKLGYAKDLRPTLVKLQEENLSAMNTDPLYSAYH YSHPPL
SEQ ID NO:6 (370) VKLGYAKDLR PALVKLQEENLSAMNTDLLYSAYH YSHPPL

```

**Figura 12D**

		481	497	
yeast-PP	(404)	-----		
SEQ ID NO:8	(401)	-----		
SEQ ID NO:2	(380)	VERLQALDETSKKTD--		
SEQ ID NO:10	(314)	VERLQALEDSDDKKED-		
human-PP	(463)	LERLQALKTMKQH----	(SEQ ID NO:25)	
SEQ ID NO:4	(410)	VERLRAIDGEDKKTD--		
SEQ ID NO:6	(410)	VERLRAIDGEDKKTD--		

**Nota: El área sombreada es la estructura de metaloproteasa de zinc (HEXXH)**

Figura 13

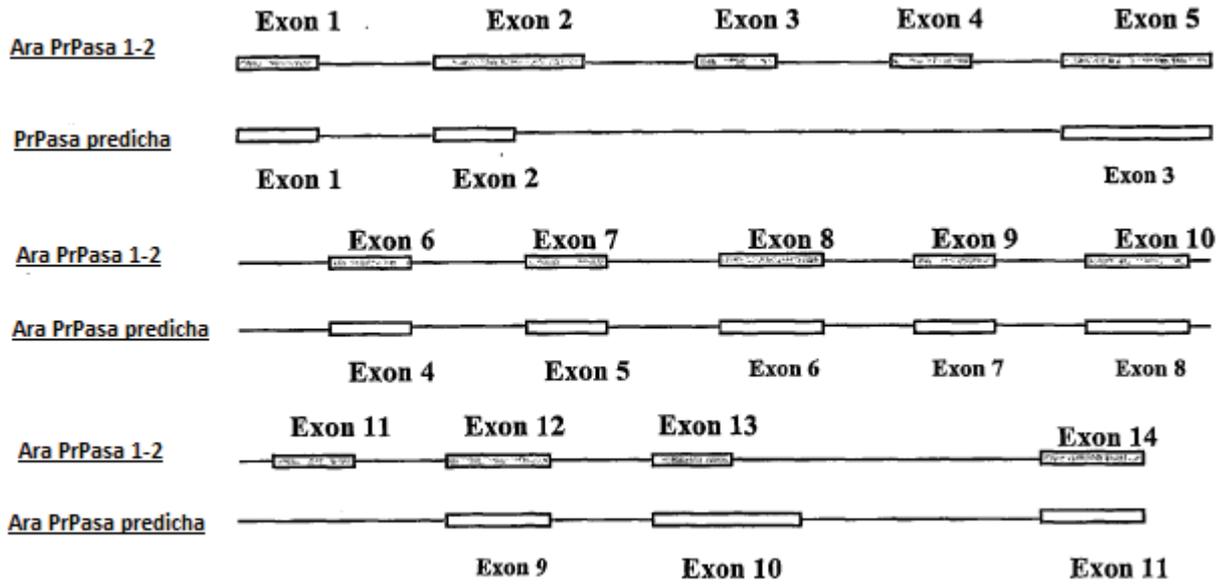
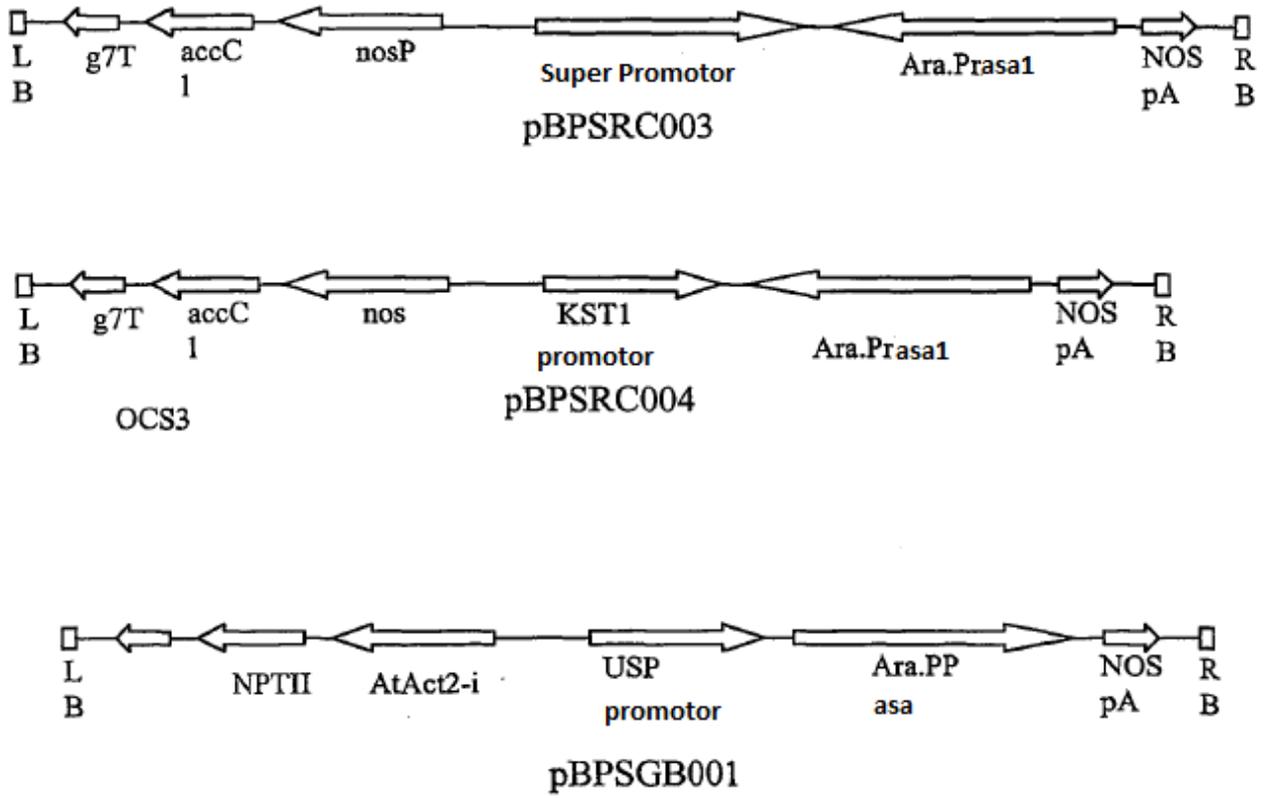


Figura 14



**Figura 15A***Promotor/AtPrPasa1*

TTGATGATGAAAAAGAGAAGATCGAAACCAAGTCTTACAAAGAAGAGCGATTCT  
 CTCAAAGGGGAAGGTAAAATTGACAAATCCACGCGCTAGCTTTTCACGTTCACTCA  
 CGCGCTACATTTTGTATAATCCACAAAACCTTCAATAAATTACAGAAAAACCTTGA  
 TAAATTTTACCATAACAACAAGATCCCTGATATTATTTTCAAATTGACTCATAAAG  
 CATTACAAAAGGAGATGGTTTTTCTGAAACATGAAATGGTTGGTTACAGAAGACGA  
 TACATACAATAGGCAGCTATGTTTCATCATCTCTTTCCTTTTCTTTAGCATCAAAGT  
 GATGAGACTTTAGTTTCTTCTTCCGCACTATCGCGCCTGTGCTGCCACCACCTCCTT  
 CCTGAAAGGCATTCCCATTAGAGCCAATAGTTTCTGTCCTTCTTGATCGCTTTTAG  
 CCGTTGTGCTGATGCATACATCCATTCCCTCTCGTTTTTCCAACGGCATCAAACCTAG  
 AGTGTAATAAACCAACCAACCAACATAGAGTTTAGTTGCTCGGTTGTAAACAAAGA  
 GTGGGACTAAAGAGAAACCATGCTTGATCTTGTTGAACCAGCGGATAACAAGTTAG  
 TAGTTTTGATTTTGAGGGTAGATAACAATAGAACTAACCTGATTTTCAGGGAATACAC  
 CTTGGTCTTTCACACCAATACTGTAGTTTCCGTTCCCATCAAAGCTACTGGGACTCA  
 CACCTTGGAATCTCGAGTTCTCGGAAGGGCTAAGTTGATAAGACGATCCAAGAAG  
 GAGTACATTACCTGTCACAACAGTCAAAATCACAAAATGTTAATACATAAATAACT  
 CAAAAGGAAAGTTTGATTAGTCAAGAGAAATATAGCTCACATCTCCTCTGAGAGTG  
 ACAGCAATCCCAAGAGGTTGATCTTCCCTGATCTTGAAAGTAGCAATGGAAGCTCT  
 AGCTCGTGTCTTAATAGGTTTCTGCCCTGTGATAAGCGCGATATCCTTCATCGCAGC  
 CTCCAAACCCTTGTCGTTCTGCGCCGCATCTCCAATACCACAATTCCTACTACAATCTT  
 CTGTACCTTTGGAACCTGGTAGAGAAGATGTCCAAGCAGATATACAACAATGATGA  
 GATTGACAAATTCACATTCACATTTGTAAATGGCACATCCCAACAGCACGATTTTAT  
 CAACACAACAATCTTAAATCTAGGCTTCTTCACTACATTTTCTAGAAGAAATCAATT  
 CAAACTTATCATTAAAAGCAAATTAGGTTTAAACATTCGCTCAAAAAATTCGAATTC  
 ACTGAGAATTAGACTTCAATCAATCGCAACAGAACAAAACTAGGTTTGTAGCTCAG  
 AGGGGAAGGATTTGGGGTTACCTGGTGAATATTAACGTACTTGAACCTTCTTTGA  
 GCGCAGGGATAATCCTCTCGAGGTAAGCGGTTTTGAGGCGTTGAGTTTTCTCGGCTT  
 CAGATTTCTCGACCAGTACAGTTCCAGACGCCGAGACTTTCACCACGTTTCTGAGC  
 GGCGGAGAGAGCATTTCGTGCGGAGGATGGAGCCGCTAATGGTGAGAAACGTCCGT  
 GAAACGAAGAAGCGGAAGACTGCAGAAGCGAAGGAGACGCCATTGTCGAAGCTCC  
 AAGTGGATAAAGTGTGAAGTGAGAGCTCTCGGCGTTCGTTGTTGATTAAACCCAAT

**Figura 15B**

GGCACCTTCGTAATTTGTTGACAGTTTGAGGATAAGGAGTTTTCCGTTTAGCCCCTT  
TAAACATAATATTTCAACTAAGGCCCAATATTTGATAATACTATTATACTTAG  
AGATTTTAGATAAAATATAGGGGTTGTTTCATATGGGCCTAAATCTCAGCCCGTTTA  
CTATTTGGGCTTCTAAGGTATAACCCGTACCCGTGTTTTTGTGTTTTACATATCCAC  
ACCGACCTGAGAAGAGTCAAAAACGAAAACCTCTCTTTTGTCGTTCCCTCTGCTTTC  
TTCGATTTGCTTCTGCTTCTTCGATTTGCTTCTGCTTTCATCGCGGTTTCAGGTCACT  
CTTTTCTCAGCCATG (SEQ ID NO:11)

**Figura 16**

Identidad (Similitud)	PpPrasa	GmPrPasa	ZmPrPasa	AtPrPasa1	AtPrPasa2
PrPrasa	-	-	-	-	-
GmPrPasa	72 (83)	-	-	-	-
ZmPrPasa	73 (86)	80 (89)	-	-	-
AtPrPasa1	84 (90)	84 (90)	82 (89)	-	-
AtPrPasa2	84 (90)	84 (90)	83 (90)	99 (99)	-